

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
1 novembre 2001 (01.11.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/81591 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C12N 15/56, 15/82, C12Q 1/68, C12N 9/24, A01H 5/00

Thimerais, F-78310 Maurepas (FR). LEPINIEC, Loïc  
[FR/FR]; 2c, Edouard Herriot, F-91440 Bures sur Yvette  
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR01/01266

(74) Mandataires : CATHERINE, Alain etc.; Cabinet Harle  
& Phelip, 7, rue de Madrid, F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international : 25 avril 2001 (25.04.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
00/05317 26 avril 2000 (26.04.2000) FR

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,  
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*)  
: INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]; 147, rue de  
l'Université, F-75341 Paris Cedex 07 (FR). CENTRE  
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
[FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16  
(FR).

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : BOISSON,  
Murielle [FR/FR]; Les Tilleuls, Graves sur Anse, F-69480  
Anse (FR). GOMORD, Véronique [FR/FR]; Parc Vi-  
valdi, Bât. A, 61, rue Chasselièvre, F-76000 Rouen (FR).  
LEROUGE, Patrice [FR/FR]; 10, rue Désiré Granet,  
F-76530 Grand Couronne (FR). FAYE, Loïc [FR/FR];  
3056, rue des Canadiens, F-76160 Saint Jacques sur  
Dametal (FR). CABOCHE, Michel [FR/FR]; 5, rue du

**Publiée :**

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: NOVEL PLANT GLUCOSIDASE I AND USE THEREOF FOR PRODUCING RECOMBINANT PROTEINS WITH  
MODIFIED GLYCOSYLATION

(54) Titre : NOUVELLE GLUCOSIDASE I DE PLANTE ET SON APPLICATION A LA PRODUCTION DE PROTEINES RE-  
COMBINANTES A GLYCOSYLATION MODIFIEE

(57) Abstract: The invention concerns a novel plant glucosidase I and nucleic acids coding for said enzyme involved in N-gly-  
cosylation of proteins during translation. The invention also concerns means for detecting said protein and nucleic acids, such as  
antibodies or nucleotide probes and primers.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une nouvelle glucosidase I végétale et des acides nucléiques codant pour cette enzyme  
participant à la N-glycosylation des protéines en cours de traduction. Elle concerne aussi des moyens de détection de cette protéine  
et de ces acides nucléiques, tels que des anticorps ou encore des sondes et des amorces nucléotidiques.

WO 01/81591 A1

Titre : NOUVELLE GLUCOSIDASE I DE PLANTE ET SON APPLICATION A LA PRODUCTION DE PROTEINES RE-COMBINANTES A GLYCOSYLATION MODIFIEE

La présente invention concerne une nouvelle glucosidase I végétale et des acides nucléiques codant pour cette enzyme participant à la N-glycosylation des protéines en cours de traduction. Elle concerne aussi des moyens de détection de cette protéine et de ces acides nucléiques, tels que des anticorps ou encore des sondes et des amorces nucléotidiques.

L'invention est également relative à des vecteurs recombinants comprenant un acide nucléique codant pour la nouvelle glucosidase I de plante, à des cellules hôtes transformées par un acide nucléique ou un vecteur recombinant selon l'invention, ainsi qu'à des plantes transgéniques dont une partie ou la totalité des cellules sont transformées avec un acide nucléique ou un vecteur recombinant selon l'invention.

L'invention a également trait à des moyens destinés à augmenter ou au contraire à inhiber l'expression d'un acide nucléique codant pour la nouvelle glucosidase I dans des plantes, dans le but de produire des protéines, tout particulièrement des protéines recombinantes, dont la glycosylation est modifiée.

Chez les plantes, comme chez tous les eucaryotes, la N-glycosylation consiste en la fixation covalente d'un oligosaccharide plus ou moins complexe sur une protéine, au niveau d'un site de glycosylation constitué de la séquence en acides aminés NXS/T, X représentant n'importe lequel des acides aminés, à l'exception de la proline (P) et de l'acide aspartique (D).

Le processus de N-glycosylation débute dans le réticulum endoplasmique avec le transfert d'un oligosaccharide précurseur du type (Glc<sub>3</sub> Man<sub>9</sub> GlcNAc<sub>2</sub>) sur le résidu N d'un site de glycosylation de la protéine en cours de traduction.

Cet oligosaccharide précurseur subit des modifications dans le réticulum endoplasmique. En premier lieu, la glucosidase I coupe un glucose et la glucosidase II coupe les deux glucoses suivants, l'oligosaccharide fixé sur le site de glycosylation ayant alors la forme (Man<sub>9</sub> GlcNAc<sub>2</sub>).

Dans un second temps, la protéine est transférée dans l'appareil de Golgi au sein duquel l'oligosaccharide va subir de nombreuses modifications additionnelles. En particulier, des résidus  $\alpha$ -1,3 fucose et  $\beta$ -1,2 xylose peuvent être ajoutés. Les résidus  $\alpha$ -1,3 fucose et  $\beta$ -1,2 xylose sont spécifiques des plantes et semblent être présents chez les mollusques, les

insectes et les nématodes; ils n'ont jamais été identifiés chez les mammifères.

Les glycannes fixés sur les sites de glycosylation des protéines jouent un rôle important dans de nombreux mécanismes. Ils permettent notamment le maintien de la structure de la protéine dans une conformation biologiquement active, ils assurent une protection de la chaîne peptidique vis-à-vis de l'attaque des enzymes protéolytiques et peuvent intervenir dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire (Weil et al., 1989).

La glucosidase I est aussi désignée mannosyl-oligosaccharide glucosidase, dont le classement international est EC : 3.2.1.106.

La glucosidase I est une enzyme membranaire du réticulum endoplasmique de type II, dont l'extrémité C-terminale se trouve dans le lumen du réticulum endoplasmique.

Cette enzyme catalyse la première étape de la *N*-glycosylation, en hydrolysant le résidu glucose terminal de l'oligosaccharide précurseur. Cette protéine a été purifiée et caractérisée chez plusieurs espèces.

Chez la levure, la glucosidase I a une taille de 95 kDa (Bause et al., 1986). La glucosidase I a également été isolée et caractérisée à partir du foie de porc (Bause et al., 1989), de la glande mammaire de bovin où elle semble être présente sous forme de tétramère (Schailubhai et al., 1987) et du foie de veau (Hettkamp et al., 1984). Dans ces trois espèces, la glucosidase I a une taille de 85 kDa et les similarités dans leurs séquences d'acides aminés respectives montrent que cette protéine est assez bien conservée au cours de l'évolution (Pukkazhenti et al., 1993).

Un ADNc humain de 2881 pb codant pour une glucosidase I a également été isolé (Kalz-Füller et al., 1995). L'analyse de la séquence en acides aminés déduite de la séquence de l'ADNc a mis en évidence un site potentiel de glycosylation sur l'acide aminé en position 655, la présence d'une zone très hydrophobe correspondant à la région transmembranaire putative allant de l'acide aminé en position 38 à l'acide aminé en position 58 vers l'extrémité N-terminale et en présence d'une région cytosolique de 37 acides aminés à l'extrémité N-terminale ainsi que d'une région C-terminale étendue située dans le lumen du réticulum endoplasmique. Il s'agit d'une protéine membranaire de type II.

Chez les végétaux, la glucosidase I a été isolée à partir de plantules de haricot (Mung Bean) par (Szumilo et al. 1986), cette enzyme ayant été étudiée en détail par Zeng et al. en 1998. Cette glucosidase I a une taille de 97 kDa et se distingue des glucosidases I animales par une sensibilité  
5 différente à des agents modifiant les acides aminés.

Par exemple, un agent modifiant des histidines inactive la glucosidase I de haricot mais pas celle de foie de porc, alors qu'un agent modifiant des cystéines n'inactive que la glucosidase I de foie de porc.

Qu'elles soient originaires d'une levure, d'un mammifère ou d'une  
10 plante, les glucosidases I connues possèdent en commun certains caractéristiques: il s'agit d'une  $\alpha$ -1,2-glucosidase dont l'activité catalytique ne nécessite pas la présence d'un ion métallique, et qui est N-glycosylée sur un seul site.

A ce jour, aucun ADN génomique ou ARN messenger codant pour  
15 une glucosidase I végétale n'a encore été isolé et caractérisé.

Or, il existe actuellement un besoin très important de moyens permettant de produire des polypeptides d'intérêt industriel dans les plantes, notamment de protéines recombinantes, et dont la glycosylation est modifiée.

20 En particulier, il existe un besoin accru de protéines produites dans les plantes, ne possédant pas des caractéristiques allergisantes conférées par les résidus fucose et xylose contenus dans les oligosaccharides complexes fixés au niveau des sites de glycosylation des protéines d'origine végétale.

25 Il existe aussi un besoin accru en protéines provenant de céréales dépourvues d'effet allergisant ou encore de protéines recombinantes d'intérêt alimentaire ou thérapeutique ne provoquant pas de phénomène d'allergie chez le consommateur ou le patient.

Afin de modifier la nature de la N-glycosylation chez les plantes, il a  
30 été envisagé de stopper la cascade des réactions enzymatiques de glycosylation, avant les étapes de maturation des glycanes, ou encore de faire produire aux plantes, par transgénèse, des oligosaccharides complexes de type animal (Chrispeels et Faye, 1998).

Il a également été envisagé d'utiliser de la castanospermine, qui est  
35 un agent inhibiteur de la glucosidase I, notamment dans des cultures de

cellules végétales en fermenteur, de manière à synthétiser des protéines portant un N-glycane de structure proche du précurseur commun à tous les eucaryotes.

L'invention a permis d'isoler et de caractériser pour la première fois le produit de transcription d'un gène codant pour une glucosidase I végétale catalysant le clivage du premier résidu glucose externe de l'oligosaccharide précurseur ( $\text{Glc}_3 \text{Man}_9 \text{Glc NAc}_2$ ) et ainsi de rendre accessibles à l'homme du métier des moyens permettant de moduler l'expression du gène correspondant chez une plante et en particulier d'inhiber ou de bloquer la traduction de la glucosidase I chez une plante, de manière à produire chez cette plante des protéines glycosylées ne comportant pas de résidus osidiques allergéniques et/ou immunogènes, tels que les résidus fucose et xylose.

Le demandeur a ainsi isolé et caractérisé un ADN complémentaire correspondant à l'ARN messager codant pour une glucosidase I chez *Arabidopsis thaliana*, le gène correspondant étant désigné *AtGCS1*.

Le demandeur a également montré que l'interruption de la séquence génomique du gène *AtGCS1* chez une plante conduisait à la production de protéines dont la glycosylation est modifiée.

Plus particulièrement, il a été montré que le blocage de l'expression du gène *AtGCS1* selon l'invention provoquait la production de protéines dont les sites de glycosylation étaient occupés par des oligosaccharides précurseurs et non des N-glycannes matures. L'analyse des protéines produites par les plantes dans lesquelles l'expression du gène *AtGCS1* a été bloquée a permis de déterminer une absence totale de résidus xylose et fucose allergènes. Le blocage de l'expression du gène de la glucosidase I végétale *AtGCS1* entraîne l'arrêt du développement de la graine.

Un mutant d'insertion d'ADN-T affecté dans la N-glycosylation des protéines a été isolé. L'ADN-T est inséré dans un gène localisé sur le BAC T1F15 issu de la banque d'ADN de *Arabidopsis thaliana* TAMU de l'écotype Columbia qui est répertoriée dans la base de données Gen Bank sous le numéro d'accès AC004393.

La séquence répertoriée dans la base de données précitée est annotée comme étant similaire à la glucosidase I humaine.

La séquence génomique du gène *AtGCS1* possède également une forte similarité (66% d'identité en acides nucléiques) avec une séquence du BAC F3I6 de la banque de données IGF répertoriée dans la base de données GenBank sous le numéro d'accès AC002396.

5 La séquence contenue dans le BAC F3I6 est également annotée comme étant similaire à la glucosidase I humaine. Des homologues entre la séquence codante du gène *AtGCS1* ont été retrouvées, par exemple avec la glucosidase I de souris, de rat et de l'homme (38% d'identité en acides nucléiques) d'une protéine putative de *C. elegans* (36% d'identité en acides  
10 nucléiques) ou de Schizosaccharomyces pombe (31% d'identité en acides nucléiques) ou encore de levure (28 % d'identité en acides nucléiques).

La séquence du gène décrit dans la base de données GenBank sous le numéro d'accès AC004353 comprendrait 20 exons et 19 introns. Selon une telle analyse, la séquence du gène contenu dans le BAC T1F15  
15 serait transcrite en un ARN messager codant pour une protéine putative d'une longueur de 864 acides aminés.

Le gène *AtGCS1* selon l'invention, qui comprend 22 exons et 21 introns, permet la synthèse d'un ARN messager codant pour une glucosidase I d'une longueur de 852 acides aminés.

20 Ainsi, un premier objet de l'invention consiste en un acide nucléique comprenant au moins 20 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide codant pour une glucosidase I ayant la séquence en acides aminés SEQ ID N°1, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

De manière préférée, un acide nucléique selon l'invention se  
25 présente sous une forme isolée et/ou purifiée.

Le terme "isolé" au sens de la présente invention, désigne un matériel biologique (acide nucléique ou protéine) qui a été soustrait à son environnement originel (l'environnement dans lequel il est localisé naturellement).

30 Par exemple, un polynucléotide présent à l'état naturel dans une plante ou un animal n'est pas isolé. Le même polynucléotide séparé des acides nucléiques adjacents au sein desquels il est naturellement inséré dans le génome de la plante ou de l'animal est considéré comme "isolé".

Un tel polynucléotide peut être inclus dans un vecteur et/ou un tel  
35 polynucléotide peut être inclus dans une composition et demeurer

néanmoins à l'état isolé du fait que le vecteur ou la composition ne constitue pas son environnement naturel.

Le terme "purifié" ne nécessite pas que le matériel soit présent sous une forme de pureté absolue, exclusive de la présence d'autres composés. Il s'agit plutôt d'une définition relative.

Un polynucléotide est à l'état "purifié" après purification du matériel de départ ou du matériel naturel d'au moins un ordre de grandeur, de préférence 2 ou 3 et préférentiellement 4 ou 5 ordres de grandeur.

Aux fins de la présente invention, l'expression "séquence nucléotidique" peut être employée pour désigner indifféremment un polynucléotide ou un acide nucléique. L'expression "séquence nucléotidique" englobe le matériel génétique lui-même et n'est donc pas restreinte à l'information concernant sa séquence.

Les termes "acide nucléique", "polynucléotide", "oligonucléotide" ou encore "séquence nucléotidique" englobent des séquences d'ARN, d'ADN, d'ADNc ou encore des séquences hybrides ARN/ADN de plus d'un nucléotide, indifféremment sous la forme simple chaîne ou sous la forme de duplex.

Le terme "nucléotide" désigne à la fois les nucléotides naturels (A, T, G, C) ainsi que des nucléotides modifiés qui comprennent au moins une modification telle que (1) un analogue d'une purine, (2) un analogue d'une pyrimidine, ou (3) un sucre analogue, des exemples de tels nucléotides modifiés étant décrits par exemple dans la demande PCT N°WO 95/04 064.

Aux fins de la présente invention, un premier polynucléotide est considéré comme étant "complémentaire" d'un second polynucléotide lorsque chaque base du premier nucléotide est appariée à la base complémentaire du second polynucléotide dont l'orientation est inversée. Les bases complémentaires sont A et T (ou A et U), ou C et G.

L'invention concerne également un acide nucléique comprenant au moins 20 nucléotides consécutifs de l'ADNc de séquence nucléotidique SEQ ID N°2 codant pour la glucosidase I végétale selon l'invention ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

En particulier, l'invention est relative à un acide nucléique comprenant la séquence nucléique SEQ ID N°2, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

L'invention a encore pour objet un acide nucléique possédant au moins 80% d'identité en nucléotides avec l'un des acides nucléiques suivants:

- 5 a) un acide nucléique comprenant au moins 20 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide codant pour une glucosidase I ayant la séquence en acides aminés SEQ ID N°1, ou un acide nucléique de séquence complémentaire;
- b) un acide nucléique comprenant au moins 20 nucléotides consécutifs de la séquence nucléotide SEQ ID N°2, ou un acide nucléique  
10 de séquence complémentaire;
- c) un acide nucléique comprenant la séquence nucléotidique SEQ ID N°2, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

Selon l'invention, un premier acide nucléique ayant au moins 80% d'identité avec un second acide nucléique de référence, possédera au moins  
15 85%, de préférence au moins 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5% ou 99,8% d'identité en nucléotides avec ce second polynucléotide de référence, le pourcentage d'identité entre deux séquences étant déterminé comme décrit ci-après.

Le " pourcentage d'identité " entre deux séquences de nucléotides  
20 ou d'acides aminés, au sens de la présente invention, peut être déterminé en comparant deux séquences alignées de manière optimale, à travers une fenêtre de comparaison.

La partie de la séquence nucléotidique ou polypeptidique dans la  
fenêtre de comparaison peut ainsi comprendre des additions ou des  
25 délétions (par exemple des " gaps ") par rapport à la séquence de référence (qui ne comprend pas ces additions ou ces délétions) de manière à obtenir un alignement optimal des deux séquences.

Le pourcentage est calculé en déterminant le nombre de positions  
auxquelles une base nucléique ou un résidu d'acide aminé identique est  
30 observé pour les deux séquences (nucléique ou peptidique) comparées, puis en divisant le nombre de positions auxquelles il y a identité entre les deux bases ou résidus d'acides aminés par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le résultat par cent afin d'obtenir le pourcentage d'identité de séquence.



L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé de manière informatique à l'aide d'algorithmes connus contenus dans l'outil logiciel de la Société WISCONSIN GENETICS SOFTWARE PACKAGE, GENETICS COMPUTER GROUP (GCG), 575 Science Doctor,  
5 Madison, Wisconsin.

De manière tout à fait préférée, le pourcentage d'identité entre deux séquences est effectué à l'aide du logiciel BLAST (version BLAST 2.06 de Septembre 1998), en utilisant exclusivement les paramètres par défaut (S.F. ALTSCHUL et al., 1990); SF ALTSCHUL et al., 1997).

10 Chacun des acides nucléiques selon l'invention qui comprend tout ou partie de l'ARNm ou de l'ADNc correspondant aux produits de transcription du gène *AtGCS1* codant pour une glucosidase I végétale peut être aisément obtenu par l'homme du métier qui en connaît sa séquence nucléotidique divulguée dans la présente description.

15 L'homme du métier peut également reproduire l'un quelconque des acides nucléiques selon l'invention en construisant, sur la base des séquences divulguées dans la présente description, des amorces oligonucléotidiques capables d'amplifier tout ou partie de ces acides nucléiques, par exemple en extrayant les ARN totaux à partir de différents  
20 tissus végétaux, puis en synthétisant les ADN complémentaires à l'aide d'une enzyme transcriptase inverse avant de réaliser plusieurs cycles d'amplification des ADNc obtenus à l'aide d'une ou plusieurs amorces hybridant spécifiquement avec les séquences cibles dont l'obtention est recherchée.

25 Un tel mode de reproduction des acides nucléiques selon l'invention est par exemple décrit dans l'exemple 1.

Après amplification spécifique d'un acide nucléique selon l'invention à l'aide des amorces appropriées, les différents acides nucléiques amplifiés peuvent alors être soumis à une étape de ligation dans un vecteur selon des  
30 techniques bien connues de l'homme du métier.

D'une manière générale, un acide nucléique ayant au moins 20 nucléotides consécutifs d'une séquence selon l'invention possède avantageusement au moins 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000 ou 2500 nucléotides consécutifs de la séquence de

référence, la longueur de nucléotides consécutifs étant naturellement limitée par la longueur de la séquence de référence.

L'homme du métier peut aussi reproduire un acide nucléique selon l'invention par synthèse chimique directe, telle que la méthode au phosphodiester décrite par Narang et al. (1979), la méthode au phosphodiester décrite par Brown et al. (1979), la méthode au diéthylphosphoramidite décrite par Beaucage et al. (1981), ainsi que la méthode sur support solide décrite dans la demande de brevet européen n°EP 0 707 792, le contenu de ces documents étant ici incorporé par référence.

Un acide nucléique selon l'invention peut également être synthétisé, à partir de l'information de séquence polynucléotidique de référence SEQ ID N°2 et SEQ ID N°5, à l'aide des techniques décrites par Wheeler et al. (1996, Gene, Vol.10 :251-255), par Wade et al. (1996, Biomedical Peptides, Proteins and nucleic acids, Vol.2 :27-32), par Martinez et al. (1996, Taxicon, Vol. 34 (11) :1413-1419), par Prapunwattana et al. (1996, Molecular and Biochemical Parasitology, vol.83: 93-106) et par Skopek et al. (1996, Mutation Research, vol.349:163-172).

Comme déjà mentionné, le demandeur a également isolé et caractérisé, chez un écotype d'*Arabidopsis thaliana*, l'écotype Wassilevskja, une plante dans le génome de laquelle le gène *AtGCS1* codant pour la glucosidase I selon l'invention a été artificiellement interrompu, par l'insertion d'une construction contenant un ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*.

Après séquençage du gène *AtGCS1* au niveau de l'ADN-T, il a été établi que l'ADN exogène a été inséré au début du huitième intron. L'insertion de l'ADN-T exogène a en outre créé une délétion de 30 pb de l'ADN génomique ainsi qu'une insertion de deux fragments nucléotidiques d'une longueur respective de 26 et 22 pb, de part et d'autre de l'ADN-T.

Ainsi, le demandeur a isolé et caractérisé un gène *Atgcs1* comportant, par rapport à la séquence du gène *AtGCS1* retrouvée naturellement, plusieurs additions et délétions de nucléotides dans la séquence codante.

Il a été montré selon l'invention que les plantes portant un gène *Atgcs1* muté pouvaient être notamment caractérisées par le phénotype de

leurs graines qui sont, pour un quart d'entre elles , ridées et incapables de germer.

Il a en outre été montré qu'une mutation du gène *AtGCS1*, lorsqu'elle est présente à l'état homozygote dans le génome, est létale pour la plante.

De plus, il a été montré selon l'invention que la glycosylation des protéines exprimées dans des plantes dans lesquelles l'expression du gène *Atgcs1* est fortement altérée, voire complètement bloquée ou inexistante était profondément modifiée et qu'en particulier les glycannes présents au niveau des sites de glycosylation de ces protéines étaient complètement dépourvus de résidus oligosaccharidiques allergènes tels que le fucose et le xylose.

En conséquence, la séquence génomique du gène *Atgcs1* ainsi que la séquence nucléotidique SEQ ID N°2 selon l'invention sont utiles notamment pour la mise au point de divers moyens destinés à inhiber ou bloquer la synthèse de la glucosidase I codée par le gène *AtGCS1*. La séquence nucléotidique SEQ ID N°2 selon l'invention est également utile pour la mise au point de divers moyens de détection spécifiques du gène *Atgcs1* ou de son produit de transcription, de tels moyens de détection permettant à l'homme du métier de déterminer si une plante d'intérêt contient dans son génome un gène *AtGCS1* fonctionnel ou au contraire un gène *Atgcs1* muté, étant entendu que la détection de la présence d'au moins une copie du gène *Atgcs1* muté dans le génome d'une plante permet de sélectionner cette plante en vue de la production de protéines non allergènes pour l'homme.

Un acide nucléique tel que défini ci-dessus code pour au moins une partie de la glucosidase I selon l'invention et peut notamment être inséré dans un vecteur recombinant destiné à l'expression du produit de traduction correspondant dans une cellule hôte ou dans une plante transformée avec ce vecteur recombinant.

Une tel acide nucléique peut aussi être utilisé pour la synthèse de sondes et d'amorces nucléotidiques destinées à la détection ou à l'amplification de séquences nucléotidiques comprises dans l'ADN génomique, l'ARN messager ou encore l'ADNc du gène *AtGCS1* dans un échantillon.

Aux fins de la détection, on peut également utiliser des acides nucléiques de séquence complémentaire à ceux définis ci-dessus.

Font également partie de l'invention les sondes et les amorces nucléiques hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique de séquence nucléotidique SEQ ID N°2.

Par conditions d'hybridation de forte stringence au sens de l'invention, on entend les conditions d'hybridation suivantes:

- L'ADN à tester est immobilisé sur des membranes de type GenScreenPlus®NEN™Life Science Product selon les instructions du fabricant, en présence de 0,4 M NaOH ; une nuit.

- Les membranes sont lavées avec un tampon 2 x SSC (1 x SSC ... idem) puis sont préhybridées au moins 30 min à 65 °C dans un tampon d'hybridation (Tampon : 7% SDS, 0,25M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4, 2 mM EDTA, 20 mg/l d'héparine, 0,1 mg/l d'ADN simple brin de thymus de veau).

- Les sondes sont ajoutées aux membranes et incubées à 65°C pendant une nuit;

- Après l'étape d'hybridation, les membranes sont lavées dans un tampon 2 x SSC, 0,5 % sarcosyl, 0,2 % pyrophosphate de sodium pendant 30 min à 65 °C

- Un second lavage est opéré dans un tapon 0,2 x SSC, 0,5 % sarcosyl, 0,2 % pyrophosphate de sodium pendant 10 min à 65 °C.

Les conditions d'hybridation décrites ci-dessus sont adaptées à l'hybridation dans des conditions de forte stringence d'une molécule d'acide nucléique d'une longueur de 300 à 400 nucléotides.

Il va sans dire que les conditions d'hybridation ci-dessus décrites peuvent être adaptées en fonction de la longueur de l'acide nucléique dont l'hybridation est recherchée ou du type de marquage choisi, selon des techniques connues de l'homme du métier.

Les conditions convenables d'hybridation peuvent par exemple être adaptées selon l'enseignement contenu dans l'ouvrage de HAMES et HIGGINS (1985) ou encore dans l'ouvrage de AUSUBEL et al; (1989).

Les sondes ou les amorces nucléotidiques selon l'invention comprennent au moins 15 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'invention, en particulier d'un acide nucléique de séquence SEQ ID N°2 ou de sa séquence complémentaire, d'un acide nucléique ayant au

moins 80% d'identité en nucléotides avec la séquence SEQ ID N°2 ou de sa séquence complémentaire ou encore d'un acide nucléique hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec la séquence SEQ ID N°2 ou sa séquence complémentaire.

5 De préférence, des sondes ou amorces nucléotidiques selon l'invention ont une longueur d'au moins 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 ou 500 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'invention, en particulier de l'acide nucléique de séquence nucléotidique SEQ ID N°2, ou d'un acide nucléique de séquence  
10 complémentaire.

Selon un autre aspect, une sonde ou une amorce nucléotidique selon l'invention consistera et/ou comprendra des fragments d'une longueur de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 ou 500 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'invention, plus particulièrement de  
15 l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°2, ou d'un acide nucléique de séquence complémentaire.

Des exemples d'amorces et de couples d'amorces sont par exemple les séquences SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4, qui permettent d'amplifier la totalité du cadre de lecture ouvert de l'ARN messager du gène  
20 *Atgcs1*.

Il peut s'agir également des amorces de séquences SEQ ID N°5 à SEQ ID N°15 selon l'invention.

Une amorce ou une sonde nucléotidique selon l'invention peut être préparée par toute méthode adaptée bien connue de l'homme du métier, y  
25 compris par clonage et action d'enzymes de restriction ou encore par synthèse chimique directe selon les techniques, telles que les méthodes de phosphodiester de Narang et al. (1979) ou de Brown et al. (1979) précitées.

Chacun des acides nucléiques selon l'invention ainsi que les sondes et amorces oligonucléotidiques décrites ci-dessus, peuvent être  
30 marqués, si désiré, en incorporant un marqueur détectable par des moyens spectroscopiques, photochimiques, biochimiques, immunochimiques ou encore chimiques.

Par exemple, de tels marqueurs peuvent consister en des isotopes radioactifs ( $^{32}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ ), des molécules fluorescentes (5-bromodéoxyuridine,

fluorescéine, acétylaminofluorène, digoxigénine) ou encore des ligands tels que la biotine.

Le marquage d'un acide nucléique est réalisé de préférence par incorporation de molécules marquées au sein de ces nucléotides par extension d'amorces, ou bien par ajout sur les extrémités 5' ou 3'.

Des exemples de marquage non radioactif de fragments d'acides nucléiques sont décrits notamment dans le brevet FR 78 19 175 ou encore dans les articles de URDEA et al. (1988), ou SANCHEZ-PESCADOR et al. (1988).

De manière avantageuse, les sondes selon l'invention peuvent avoir des caractéristiques structurales de nature à permettre une amplification du signal, telles que les sondes décrites par URDEA et al; (1991) ou encore dans le brevet européen n° EP 0 225 807 (Chiron).

Les sondes oligonucléotidiques selon l'invention peuvent être utilisées notamment dans des hybridations de type Southern à l'ADN génomique, ou encore dans des hybridations à l'ARN messager du gène *Atgcs1*, lorsqu'une visualisation de l'expression du transcrit correspondant est recherchée dans un échantillon.

Les sondes selon l'invention peuvent aussi être utilisées pour la détection de produits d'amplification PCR ou encore pour la détection de mésappariements.

Des sondes ou amorces nucléotidiques selon l'invention peuvent être immobilisées sur un support solide. De tels supports solides sont bien connus de l'homme du métier et comprennent des surfaces des puits de plaque de microtitration, des billes de polystyrène, des billes magnétiques, des bandes de nitrocellulose ou encore des microparticules telles que des particules de latex.

La présente invention concerne également un procédé de détection de la présence d'un acide nucléique du gène *AtGCS1* dans un échantillon, ladite méthode comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact une sonde ou une pluralité de sondes nucléotidiques selon l'invention avec l'échantillon à tester, susceptible de contenir un acide nucléique du gène *AtGCS1*;

- détecter l'hybride éventuellement formé entre la ou les sondes et l'acide nucléique présent dans l'échantillon.

Selon un mode de réalisation particulier du procédé de détection  
5 selon l'invention, la ou les sondes oligonucléotidiques sont immobilisées sur un support.

Selon un autre aspect, les sondes oligonucléotidiques comprennent un marqueur détectable.

L'invention concerne en outre un nécessaire ou kit pour la détection  
10 de la présence d'un acide nucléique du gène *AtGCS1* (ADNg, ADNc, ARNm) dans un échantillon, ledit nécessaire comprenant:

a) une ou plusieurs sondes nucléotidiques, telles que décrites ci-dessus;

15

b) le cas échéant, les réactifs nécessaires à la réaction d'hybridation.

Selon un premier aspect, le nécessaire ou kit de détection est caractérisé en ce que la ou les sondes sont immobilisées sur un support.

20

Selon un second aspect, le nécessaire ou kit de détection est caractérisé en ce que les sondes oligonucléotides comprennent un marqueur détectable.

25

Selon un mode de réalisation particulier du kit de détection décrit ci-dessus, un tel kit comprendra une pluralité de sondes oligonucléotidiques conformes à l'invention qui pourront être utilisées pour détecter des séquences cibles d'intérêt du gène *AtGCS1* ou encore détecter des mutations dans les régions codantes du gène *AtGCS1*, plus particulièrement dans l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°2 où un acide nucléique de séquence complémentaire.

30

Les amorces nucléotidiques selon l'invention peuvent être utilisées pour amplifier un fragment nucléotidique quelconque (ADNg, ADNc, ARNm) de *AtGCS1*, et plus particulièrement tout ou partie d'un acide nucléique de séquence SEQ ID N°2.

Un autre objet de l'invention concerne un procédé pour  
35 l'amplification d'un acide nucléique du gène *AtGCS1*, et plus

particulièrement un acide nucléique de séquence SEQ ID N°2 ou un fragment ou encore un acide nucléique de séquence complémentaire à ce dernier, contenu dans un échantillon, ledit procédé comprenant les étapes consistant à :

5

a) mettre en contact l'échantillon dans lequel la présence de l'acide nucléique cible est suspectée avec un couple d'amorces nucléotidiques selon l'invention;

10

b) réaliser au moins un cycle d'amplification de l'acide nucléique contenu dans l'échantillon;

c) détecter de l'acide nucléique éventuellement amplifié.

15

Selon le procédé d'amplification ci-dessus, on réalise au moins un cycle d'amplification de l'acide nucléique contenu dans l'échantillon préalablement à la détection de l'acide nucléique éventuellement amplifié, de préférence au moins 10, et de manière tout à fait préférée au moins 20, cycles d'amplification.

20

Pour mettre en oeuvre le procédé d'amplification ci-dessus, on aura avantageusement recours à l'une quelconque des amorces nucléotidiques précédemment décrites dont la position d'hybridation est localisée respectivement du côté 5' et du côté 3' de la région de l'acide nucléique cible de *AtGCS1* dont l'amplification est recherchée, en présence des réactifs

25

nécessaires à la réaction d'amplification .

L'invention a en outre pour objet un nécessaire ou kit pour l'amplification d'un acide nucléique du gène *AtGCS1* (ADNg, ADNc ou ARNm) selon l'invention, et plus particulièrement tout ou partie d'un acide nucléique de séquence SEQ ID N°2, ledit nécessaire ou kit comprenant:

30

a) un couple d'amorces nucléotidiques conformes à l'invention;

b) le cas échéant, les réactifs nécessaires à la réaction d'amplification.

35



Un tel nécessaire ou kit d'amplification comprendra avantageusement au moins une paire d'amorces nucléotidiques telle que précédemment décrites dont la position d'hybridation est localisée respectivement du côté 5' et du côté 3' de l'acide nucléique cible du gène *AtGCS1* dont l'amplification est recherchée.

Selon un mode de réalisation préféré, des amorces selon l'invention comprennent tout ou partie d'un polynucléotide choisi parmi des séquences nucléotidiques SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4.

L'invention a également trait à des procédés destinés à inhiber ou bloquer l'expression du gène *AtGCS1* dans les cellules de tissus de plantes, en vue de la production de protéines glycosylées par des glycanes non allergènes, par des techniques appropriées bien connues de l'homme du métier.

Afin d'inhiber ou de bloquer l'expression du gène *AtGCS1* chez une plante, l'homme du métier pourra notamment recourir à l'utilisation de polynucléotides antisens, ou encore à des techniques de co-suppression.

Ainsi, l'invention concerne aussi un polynucléotide antisens capable de cibler spécifiquement une région déterminée du gène *AtGCS1* et plus particulièrement à une région déterminée de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2, capable d'inhiber ou de bloquer sa transcription et/ou sa traduction. Un tel polynucléotide répond à la définition générale des sondes et des amorces selon l'invention.

Selon un premier aspect, un polynucléotide antisens selon l'invention hybride avec une séquence correspondant à une séquence localisée dans une région de l'extrémité 5' de l'ARN messager du gène *AtGCS1*, et de manière tout à fait préférée à proximité du codon d'initiation de la traduction (ATG) du gène *AtGCS1*.

Pour construire un tel polynucléotide antisens, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à la séquence de l'ADNc du gène *AtGCS1* référencée comme la séquence nucléotidique SEQ ID N° 2.

Selon un second aspect, un polynucléotide antisens selon l'invention comprend une séquence correspondant à une des séquences localisées au niveau des jonctions exon/intron du gène *AtGCS1* et de manière préférée aux séquences correspondant à un site d'épissage, qui peuvent être déterminées selon des techniques bien connues de l'homme

du métier, sur la base de la description des séquences de l'invention, tout particulièrement des séquences SEQ ID N°5 et SEQ ID N°2.

Selon un troisième aspect, un polynucléotide antisens conforme à l'invention comprend la totalité de l'ADNc correspondant au produit de transcription du gène *AtGCS1*. De manière tout à fait préférée, un  
5 polynucléotide antisens selon l'invention comprend la séquence nucléotidique SEQ ID N°2, ou consiste en la séquence SEQ ID N°2.

Pour synthétiser des polynucléotides antisens tels que définis ci-dessus, l'homme du métier pourra se référer aux positions des différents  
10 exons et introns du gène *AtGCS1* dans la séquence nucléotidique SEQ ID N°5.

De manière générale, les polynucléotides antisens doivent avoir une longueur et une température de fusion suffisantes pour permettre la formation d'un hybride duplex intracellulaire ayant une stabilité suffisante  
15 pour inhiber l'expression de l'ARNm de *AtGCS1*.

Des stratégies pour construire des polynucléotides antisens sont notamment décrites par GREEN et al. (1986) et IZANT et WEINTRAUB (1984), le contenu de ces deux articles étant ici incorporé par référence.

Des méthodes de construction de polynucléotides antisens sont  
20 également décrites par ROSSI et al. (1991) ainsi que dans les demandes PCT n°WO 94/23 026, WO 95/04141, WO 92/18522 et dans la demande de brevet européen n° EP 0 572 287, le contenu de ces documents étant incorporé par référence.

Avantageusement, un polynucléotide antisens selon l'invention a  
25 une longueur de 15 à 4000 nucléotides. Un polynucléotide antisens de l'invention a préférentiellement une longueur de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 à 75, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000 ou 4000 nucléotides.

Parmi les polynucléotides antisens selon l'invention, sont préférés ceux ayant respectivement une longueur d'environ 300 nucléotides ou une  
30 longueur d'environ 4000 nucléotides.

Afin d'inhiber ou de bloquer l'expression du gène *AtGCS1*, on peut aussi avoir recours simultanément à une pluralité de polynucléotides antisens tels que définis ci-dessus, chacun des polynucléotides antisens hybridant avec une région distincte du gène *AtGCS1* ou de son ARN  
35 messenger.

D'autres méthodes de mise en oeuvre des polynucléotides antisens sont par exemple celles décrites par SCZAKIEL et al. (1995).

L'invention a encore pour objet tout procédé bien connu de l'homme du métier permettant de créer des modifications, par exemple une ou plusieurs additions, délétions ou substitutions d'au moins un nucléotide dans la séquence du gène *AtGCS1*, de telles modifications ayant pour conséquence soit une inhibition ou un blocage de la transcription du gène *AtGCS1*, soit un défaut dans l'épissage du pré-ARN messager, soit une inhibition ou un blocage de la traduction de l'ARN messager mature, dans la glucosidase I selon l'invention, soit encore dans la production d'une glucosidase I mutée ayant une activité catalytique réduite ou nulle.

Des techniques de mutagenèse de la séquence génomique du gène *AtGCS1* appropriées sont par exemple décrites par Hohn et Puchta (1999).

Une plante dont le génome a été modifié comme décrit ci-dessus est capable de synthétiser des protéines à glycosylation modifiée non allergènes et/ou non immunogènes, en particulier l'ensemble des protéines produites naturellement par la plante et destinées à l'alimentation humaine ou animale, telles que celles décrites par Zeng et al. (1997).

En outre, une telle plante affectée dans l'expression de l'activité catalytique de la glucosidase I selon l'invention, peut être utilisée afin de produire des protéines recombinantes déterminées non allergènes et/ou non immunogènes destinées à une utilisation chez l'homme ou l'animal.

De préférence, les plantes rendues déficientes dans l'activité catalytique de la glucosidase I selon l'invention sont utilisées en vue de la production de protéines immunogènes et de protéines antigéniques non allergéniques destinées à la préparation de vaccins pour l'immunisation de l'homme ou de l'animal. Tout type de peptide ou protéine immunogène ou antigénique recombinant peut ainsi être produit par une plante dont le gène *AtGCS1* a subi au moins une addition, délétion ou substitution d'un ou plusieurs nucléotides consécutifs.

Selon un autre aspect, les N-glycannes ayant subi un processus partiel de maturation dû à l'absence, ou à un taux réduit, de glucosidase I catalytiquement active dans des plantes dans lesquelles le gène *AtGCS1* a été modifié comme décrit ci-dessus, et qui comprennent essentiellement la

structure (Glc<sub>3</sub> Man<sub>7</sub> GlcNAc<sub>2</sub>) peuvent être utilisés, après séparation et purification, comme vecteurs de composés d'intérêt thérapeutique vers des cellules cibles déterminées chez les mammifères et en particulier chez l'homme. En effet, ces glycanes partiellement modifiés ont une affinité particulière pour des lectines exprimées spécifiquement à la surface membranaire de certaines catégories cellulaires et ont déjà permis l'adressage d'agents antiviraux vers les hépatocytes et les macrophages (Murray et al., 1987).

Selon un autre mode de réalisation préféré selon l'invention, une surexpression du gène *AtGCS1* ou de son produit de transcription, ou encore de la protéine glucosidase I selon l'invention sera recherchée.

Une forte expression du gène *AtGCS1* chez une plante peut être atteinte soit par la surexpression du gène *AtGCS1*, soit par l'insertion de multiples copies d'un polynucléotide codant pour la glucosidase I selon l'invention dans la plante, soit encore par une combinaison de ces deux stratégies.

Pour l'insertion de multiples copies d'un polynucléotide codant pour la glucosidase I selon l'invention dans le génome d'une plante, on aura avantageusement recours à un vecteur recombinant selon l'invention.

L'invention est également relative à un vecteur recombinant comprenant un acide nucléique selon l'invention.

Avantageusement, un tel vecteur recombinant comprend un acide nucléique choisi parmi les acides nucléiques suivants:

a) un acide nucléique comprenant au moins 20 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide codant pour une glucosidase I ayant la séquence en acides aminés SEQ ID N°1 ; ou un acide nucléique de séquence complémentaire ;

b) un acide nucléique comprenant au moins 20 nucléotides consécutifs de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2, ou un acide nucléique de séquence complémentaire ;

c) un acide nucléique comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité en nucléotide avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°2, ou un acide nucléique de séquence complémentaire;

5 d) un polynucléotide antisens ou un polynucléotide homopurine ou homopyrimidine, tel que défini plus haut, utile pour inhiber l'expression du gène *Atgcs1*.

10 Par "vecteur" au sens de la présente invention, on entendra une molécule d'ADN ou d'ARN circulaire ou linéaire qui est indifféremment sous forme de simple brin ou double brin.

Un vecteur recombinant selon l'invention est indifféremment un vecteur de clonage, un vecteur d'expression, ou plus spécifiquement un vecteur d'insertion, un vecteur de transformation ou un vecteur d'intégration.

15 Il peut s'agir d'un vecteur d'origine bactérienne ou virale.

Selon un premier mode de réalisation, un vecteur recombinant selon l'invention est utilisé dans le but d'amplifier l'acide nucléique qui y est inséré après transformation ou transfection de l'hôte cellulaire désiré.

20 Selon un second mode de réalisation, il s'agit d'un vecteur d'expression comprenant, outre un acide nucléique codant pour un polypeptide conforme à l'invention, en particulier le polypeptide de séquence en acides aminés SEQ ID N°1, des séquences régulatrices permettant d'en diriger la transcription et/ou la traduction.

25 En outre, les vecteurs recombinants selon l'invention pourront inclure une ou plusieurs origines de réplication chez les hôtes cellulaires dans lesquels leur amplification ou leur expression est recherchée ainsi que des marqueurs de sélection.

30 Dans un mode de réalisation particulier, un vecteur recombinant selon l'invention comprend un polynucléotide antisens ou un polynucléotide homopurine ou homopyridine, tel que défini précédemment, le cas échéant placé sous le contrôle des séquences de régulation appropriées permettant d'en assurer l'expression dans une cellule hôte ou une plante choisie. Un tel vecteur recombinant est utilisé de préférence pour inhiber l'expression du gène *Atgcs1* dans la cellule ou dans la plante.

Selon un autre mode de réalisation particulier, un vecteur recombinant selon l'invention comprend un polynucléotide codant pour le polypeptide ATGCS1 ou un polypeptide ayant au moins 80% d'identité en acides aminés avec ce dernier et conservant l'activité biologique de ATGCS1, placé sous le contrôle de séquence(s) de régulation permettant une expression à haut niveau de ATGCS1 ou de son homologue dans une cellule hôte ou dans une plante choisie. Un tel vecteur recombinant est utile pour permettre un haut niveau d'expression de ATGCS1 chez une plante .

Selon un aspect avantageux, un tel vecteur recombinant est un vecteur intégratif permettant l'insertion de multiples copies de la séquence codante de ATGCS1 dans le génome d'une plante.

A titre d'exemple, les promoteurs bactériens pourront être les promoteurs LacI, LacZ, les promoteurs de l'ARN polymérase du bactériophage T3 ou T7, les promoteurs PR, ou PL du phage lambda.

Des promoteurs pour l'expression d'un acide nucléique codant pour une glucosidase I selon l'invention dans les plantes sont le promoteur CaMV 35 S du virus de la mosaïque du chou-fleur (Odell et al., 1985) ou encore le promoteur du gène de l'actine 1 du riz (McElroy et al. 1990).

On peut aussi utiliser le promoteur de la FAH (Brevet numéro : Fn°9907362) qui permet d'exprimer un gène de façon forte et constitutive dans toutes les parties de la plantes sauf dans les graines, utilisable pour les stratégies sens et antisens, ou encore des promoteurs inductibles du système à deux composantes (ref McNellis T.W. et al. 1998, " Glucocorticoid-inducible expression of bacterial avirulence gene in transgenic arabidopsis induces hypersensitive cell death. " Plant Journal, 14 (2) : 247-257

D'autres promoteurs utiles pour l'expression d'un polynucléotide d'intérêt dans les plantes sont décrits dans les brevets n°US 5,750,866 et US n°5,633,363, incorporés ici par référence.

De manière générale, pour le choix d'un promoteur adapté, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à l'ouvrage de Sambrook et al. (1989) précité ou encore aux techniques décrites par Fuller et al. (1996), et Ausubel et al. (1989).

Les vecteurs bactériens préférés selon l'invention sont par exemple les vecteurs pBR 322 (ATCC N°37017) ou encore des vecteurs tels pAA223-

3 (Pharmacia Uppsala, Suède) et pGEM1, pBSSK et pGEM-T (Promega Biotech, Madison, WU, USA) et pUC19 (commercialisé par Boehringer Mannheim, Germany).

On peut encore citer d'autres vecteurs commercialisés tels que les  
5 vecteurs pQE70, pQE60, pQE9 (Qiagen, psuX 174, pBluescript SA, pNH8A, pMH16A, pMH18A, pMH46A, pWLNEO, pSG2CAT, pOG44, pXTI, pSG (Stratagene).

Il peut s'agir également de vecteurs de type baculovirus tels que le  
vecteur pVL1392/1393 (PharMingen) utilisé pour transférer les cellules de  
10 la lignée Sf9 (ATC N°CRL 1711) dérivée de *Spodoptera frugidera*.

Préférentiellement, on aura recours à des vecteurs spécialement adaptés pour l'expression de séquences d'intérêts dans des cellules de plantes, tels que les vecteurs suivants:

15 • vecteur pBIN19 (Bevan et al., Nucleic Acids Research, Vol.12:8711-8721, commercialisé par la Société Clontech, Palo Alto, Californie, USA);

• vecteur pB101 (Jefferson 1987, Plant Molecular Biology Reporter, vol. 5: 387-405, commercialisé par la Société Clontech);  
20

• vecteur pBI121 (Jefferson et al. 1987, Plant Molecular Biology Reporter, vol. 5:387:405, commercialisé par la Société Clontech);

25 • vecteur pEGFP (Cormack BP et al., 1996, commercialisé par la Société Clontech);

• vecteurs pAOV, pOV2, pSOV, pSOV2, pkMB et pSMB (Mylne et al., 1996).

30

Pour permettre l'expression des polynucléotides selon l'invention, ces vecteurs doivent être introduits dans une cellule hôte. L'introduction des polynucléotides selon l'invention dans une cellule hôte peut être réalisée in vitro, selon les techniques bien connues de l'homme du métier pour

transformer ou transfecter des cellules, soit en culture primaire, soit sous la forme de lignées cellulaires.

L'invention a en outre pour objet une cellule hôte transformée avec un acide nucléique ou par un vecteur recombinant selon l'invention.

5 Une telle cellule hôte transformée est préférentiellement d'origine procaryote ou eucaryote, notamment bactérienne, fongique ou végétale.

Ainsi, peuvent être notamment utilisées des cellules bactériennes de différentes souches de *E. coli* ou encore d'*Agrobacterium tumefaciens*.

10 De manière préférée, la cellule hôte transformée est une cellule de plante ou encore un protoplaste de plante.

De manière tout à fait préférée, il s'agit d'une cellule ou d'un protoplaste de colza, de tabac, de maïs, d'orge, de blé, de luzerne, de tomate, de pomme de terre, de bananier ou d'*Arabidopsis thaliana*.

15 L'invention concerne aussi un organisme multicellulaire végétal transformé, caractérisé en ce qu'il comprend une cellule hôte transformée ou une pluralité de cellules hôtes transformées avec un acide nucléique selon l'invention ou avec un vecteur recombinant selon l'invention.

20 Selon un premier aspect, l'organisme multicellulaire végétal est transformé avec un ou plusieurs nucléotides antisens et/ou un plusieurs polynucléotides homopurine ou homopyrimidine afin d'inhiber ou de bloquer l'expression du gène *AtGCS1* chez cet organisme.

25 Selon un second aspect, l'organisme multicellulaire végétal est transformé avec une ou plusieurs copies d'un polynucléotide codant pour la glucosidase I selon l'invention ou pour un polypeptide ayant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la glucosidase I et conservant l'activité biologique permettant la maturation normale des glycanes fixés sur les sites de glycosylation des protéines en cours de synthèse..

30 L'invention a encore pour objet une plante transgénique, c'est-à-dire une plante transformée comprenant, préférentiellement sous une forme intégrée dans son génome, un acide nucléique du gène *Atgcs1* et préférentiellement un polynucléotide antisens ou encore un acide nucléique codant pour le polypeptide *ATGCS1* ou un polypeptide homologue, ledit acide nucléique ayant été inséré dans le génome de la plante par transformation avec un acide nucléique de *AtGCS1* ou un vecteur  
35 recombinant selon l'invention.



Préférentiellement, une plante transformée selon l'invention est un colza, un tabac, un maïs, un soja, un blé, une orge, une luzerne, une tomate, une pomme de terre, une plante à fruits telle le bananier ou *Arabidopsis thaliana*.

5 Selon un premier aspect, les plantes transgéniques telles que définies ci-dessus présentent une expression réduite, une expression indétectable ou une absence d'expression du gène *AtGCS1* et sont ainsi susceptibles de permettre la production de protéines à glycosylation  
10 modifiée et non allergènes et/ou non immunogènes pour l'homme ou l'animal. Selon un mode de réalisation particulier, de telles plantes synthétisent une protéine d'intérêt dont la séquence codante a été introduite artificiellement, cette séquence codante pouvant être sous une forme non intégrée au génome de la plante, ou au contraire sous une forme intégrée dans le génome de la plante. La protéine d'intérêt peut être de toute nature,  
15 préférentiellement une protéine destinée à l'alimentation ou à la thérapie de l'homme ou l'animal, en particulier l'immunothérapie ou la vaccination.

L'invention concerne ainsi également une protéine à glycosylation modifiée, caractérisée en ce qu'elle est produite par une plante transformée selon l'invention, ou encore par une cellule hôte transformée selon  
20 l'invention, dans laquelle l'expression du gène *AtGCS1* est inhibée ou bloquée, ou caractérisée en ce qu'elle est contenue dans une semence d'une plante transformée selon l'invention. De préférence, la protéine à glycosylation modifiée est une protéine recombinante. Il peut s'agir d'une protéine recombinante destinée à l'alimentation ou à la thérapie humaine ou  
25 animale. Une telle protéine recombinante peut être un antigène ou un immunogène utile dans une composition de vaccin.

L'invention concerne aussi l'addition d'un ou de plusieurs site(s) de N-glycosylation dans une protéine recombinante d'intérêt afin de modifier son ciblage et/ou sa stabilité, dans des cellules végétales, un tissu végétal  
30 ou une plante transformée selon l'invention.

Selon un second aspect, les plantes transgéniques telles que définies ci-dessus ont la propriété d'exprimer fortement une glucosidase I selon l'invention.

L'invention a en outre pour objet un procédé d'obtention d'une plante transgénique transformée avec un acide nucléique selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

5 a) obtention d'une cellule hôte transformée végétale telle que définie ci-dessus;

b) régénération d'une plante entière à partir de la cellule hôte végétale transformée obtenue à l'étape a);

10 c) sélection des plantes obtenues à l'étape b) ayant intégré l'acide nucléique d'intérêt.

L'invention est également relative à un procédé d'obtention d'une  
15 plante transgénique, transformée avec un acide nucléique selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

a) transformer une cellule de plante avec un acide nucléique du gène *AtGCS1* ou avec un vecteur recombinant selon l'invention;

20 b) régénérer une plante entière à partir de cellules de plantes transformées obtenues à l'étape a);

c) sélectionner les plantes ayant intégré l'acide nucléique du gène  
25 *AtGCS1* d'intérêt.

L'invention concerne aussi un procédé d'obtention d'une plante transformée, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

30 a) obtention d'une cellule hôte d'*Agrobacterium tumefaciens* transformée avec un acide nucléique ou un vecteur recombinant selon l'invention;

b) transformation de la plante choisie par infection avec des cellules  
35 d'*Agrobacterium tumefaciens* obtenues à l'étape a);

c) sélection des plantes ayant intégré l'acide nucléique selon l'invention.

L'un quelconque des procédés d'obtention d'une plante  
5 transgénique ci-dessus décrit peut en outre comporter les étapes  
additionnelles suivantes:

d) croisement entre elles des deux plantes transformées telles  
qu'obtenues à l'étape c);

10

e) sélection des plantes hétérozygotes pour le transgène.

Selon un autre aspect, l'un quelconque des procédés ci-dessus  
décrits pourra en outre comprendre les étapes suivantes:

15

d) croisement d'une plante transformée obtenue à l'étape c) avec  
une plante de la même espèce;

e) sélection des plantes issues du croisement de l'étape d) ayant  
20 conservé le transgène.

L'homme du métier est capable de mettre en oeuvre de nombreux  
procédés de l'état de la technique afin d'obtenir des plantes transformées  
avec un acide nucléique du gène *AtGCS1* selon l'invention.

25

L'homme du métier pourra se référer avantageusement à la  
technique décrite par BECHTOLD et al. (1993) afin de transformer une  
plante à l'aide de la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*.

Les techniques utilisées dans d'autres types de vecteurs peuvent  
également être utilisées telles que les techniques décrites par BOUCHEZ et  
30 al. (1993) ou encore par HORSCH et al. (1984).

L'homme du métier peut encore se référer à la technique décrite  
par Gomord et al. (1998).

L'invention a en outre pour objet une plante transformée telle  
qu'obtenue selon l'un quelconque des procédés d'obtention décrits ci-  
35 dessus.

L'invention concerne également une semence de plante dont une partie ou la totalité des cellules constitutives comprennent un acide nucléique du gène *AtGCS1* selon l'invention qui a été artificiellement inséré dans leur génome.

5 L'invention a encore pour objet une semence d'une plante transgénique telle que définie ci-avant.

L'invention concerne aussi une cellule végétale comprenant un acide nucléique du gène *AtGCS1*. De préférence, l'acide nucléique du gène *AtGC1* se présente sous une forme intégrée au génome de ladite cellule  
10 végétale.

L'invention concerne également un tissu végétal constitué d'un ensemble de cellules végétales transformées telles que définies ci-dessus.

Un autre objet de l'invention consiste en l'utilisation d'un acide nucléique du gène *AtGCSt* selon l'invention pour l'expression *in vitro* ou *in vivo*, de préférence *in planta*, de la glucosidase I selon l'invention ou d'un  
15 fragment peptidique de celle-ci.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un acide nucléique antisens, selon l'invention pour inhiber ou pour bloquer l'expression du gène codant pour la glucosidase I selon l'invention.

20 De manière préférée, les utilisations ci-dessus sont caractérisées en ce qu'il s'agit d'une expression *in vivo* chez une plante transformée avec un tel acide nucléique.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un acide nucléique antisens  
25 selon l'invention pour inhiber ou pour bloquer l'expression *in vitro* ou *in vivo* du gène codant pour la glucosidase I selon l'invention, et tout particulièrement la glucosidase I ayant la séquence en acides aminés SEQ ID N°1.

L'acide nucléique antisens ou l'acide nucléique homopurine ou  
30 homopyrimidine est préférentiellement utilisé pour inhiber ou bloquer l'expression du gène *AtGCS1* *in vivo*, dans la plante transformée avec un tel acide nucléique.

La glucosidase I selon l'invention ayant la séquence d'acides aminés SEQ ID N°1 a une longueur de 852 acides aminés. Cette protéine a  
35 un poids moléculaire calculé de 97,5 kDa. Après analyse de la séquence, le

demandeur a identifié une région hydrophile contenant plusieurs arginines dont la partie N-terminale du polypeptide de séquence SEQ ID N°1, cette région hydrophile contenant le signal consensus de rétention dans le réticulum endoplasmique des protéines membranaires de type II, dont  
5 l'extrémité C-terminale se trouve dans le lumen.

Cette région hydrophile est constituée de la région allant de l'acide aminé en position 1 à l'acide aminé en position 38 de la séquence en acides aminés SEQ ID N°1.

La glucosidase I selon l'invention comprend aussi une région  
10 hydrophobe correspondant à un domaine transmembranaire, cette région hydrophobe allant de l'acide aminé en position 38 jusqu'à l'acide aminé en position 17 de la séquence en acides aminés SEQ ID N°1.

La glucosidase I selon l'invention comprend un site unique de fixation au glycanne localisé de l'acide aminé en position 598 à l'acide aminé  
15 en position 606 de la séquence en acides aminés SEQ ID N°1. Un site unique de glycosylation a également été identifié, qui s'étend de l'acide aminé en position 662 à l'acide aminé en position 664 de la séquence en acides aminés SEQ ID N°1.

De plus, la glucosidase I selon l'invention comprend une large  
20 région hydrophile, probablement localisée dans le lumen du réticulum endoplasmique, s'étendant de l'acide aminé en position 68 jusqu'à l'acide aminé C-terminal en position 852 de la séquence en acides aminés SEQ ID N°1.

Comme déjà rappelé, le demandeur a montré que des mutations  
25 dans la séquence du gène *AtGCS1* codant pour la glucosidase I de séquence SEQ ID N°1 selon l'invention conduisent à l'absence d'activité glucosidase I dans la plante ainsi mutée et simultanément à l'expression d'un phénotype de glycosylation modifiée dans les protéines produites par cette plante mutée.

30 Selon un autre aspect l'invention concerne également un polypeptide codé par un acide nucléique du gène *AtGCS1*, et de préférence un polypeptide comprenant au moins 7 acides aminés consécutifs de la glucosidase I de séquence en acides aminés SEQ ID N°1.

De préférence, un tel polypeptide comprend au moins 20, 25, 30,  
35 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600,

700, ou 800 acides aminés consécutifs du polypeptide ATGCS1 de séquence en acides aminés SEQ ID N°1

L'invention est également relative à un polypeptide comprenant les séquences en acides aminés ayant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence du polypeptide ATGCS1 SEQ ID N°1, ou à un  
5 fragment peptidique de ce dernier.

Avantageusement, fait partie de l'invention un polypeptide ayant au moins 60%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% d'identité en acides aminés avec la séquence du polypeptide ATGCS1 de séquence SEQ ID N°1, ou un  
10 fragment peptidique de ce dernier.

De manière générale, les polypeptides selon l'invention se présentent sous une forme isolée ou purifiée.

L'invention est également relative à un procédé pour la production du polypeptide ATGCS1 de séquence SEQ ID N°1, ou d'un fragment  
15 peptidique de ce dernier.

Un procédé préféré pour la production du polypeptide ATGCS1 de séquence SEQ ID N°1 les étapes suivantes consistant à :

a) insérer un acide nucléique codant pour le polypeptide ATGCS1  
20 ou un fragment peptidique de ces derniers, dans un vecteur approprié;

b) cultiver, dans un milieu de culture approprié, une cellule hôte préalablement transformée ou transfectée avec le vecteur recombinant de l'étape a);  
25

c) récupérer le milieu de culture conditionné ou lysé la cellule hôte transformée, par exemple par sonication ou par choc osmotique;

d) séparer et purifier à partir du milieu de culture ou encore à partir  
30 des lysats cellulaires obtenus à l'étape c), ledit polypeptide;

e) le cas échéant, caractériser le polypeptide recombinant produit.

Les peptides selon l'invention peuvent être caractérisés par fixation  
35 sur une colonne de chromatographie d'immunoaffinité sur laquelle les

anticorps dirigés contre ces polypeptides où un fragment ou un variant de ces derniers ont été préalablement immobilisés.

Selon un autre aspect, un polypeptide recombinant selon l'invention peut être purifié par passage sur une colonne de chromatographie selon les méthodes connues de l'homme de l'art et décrites par exemple par  
5 AUSUBEL F. et al. (1989) précité.

Un polypeptide selon l'invention peut être également préparé par les techniques classiques de synthèse chimique indifféremment en solution homogène ou en phase solide.

10 A titre illustratif, un polypeptide selon l'invention pourra être préparé par la technique en solution homogène décrite dans Houben Weyl (1974) ou encore la technique de synthèse en phase solide décrite par Merrifield (1965a, 1965b).

Font également partie de l'invention des polypeptides dits  
15 "homologues" aux polypeptides ATGCS1, ou de leurs fragments.

De tels polypeptides homologues ont des séquences d'acides aminés possédant une ou plusieurs substitutions d'un acide aminé par un acide aminé équivalent, par rapport au polypeptide de référence.

On entendra par acides aminés équivalents selon la présente  
20 invention, par exemple le remplacement d'un résidu sous la forme L par un résidu sous la forme D ou encore le remplacement d'un acide glutamique (E) par un acide pyro-glutamique selon des techniques bien connues de l'homme du métier.

A titre illustratif, la synthèse de peptides contenant au moins un  
25 résidu sous la forme D est décrite par Koch et al. (1977).

Selon un autre aspect, sont également considérés comme des acides aminés équivalents deux acides aminés appartenant à la même classe, c'est-à-dire deux acides aminés acides, basiques, non polaires ou encore polaires non chargés.

30 Fait également partie de l'invention un polypeptide comprenant des modifications d'acides aminés de 1, 2, 3, 4, 5, 10 à 20 substitutions, additions ou délétions d'un acide aminé par rapport à la séquence d'acides aminés du polypeptide ATGCS1 selon l'invention.

De préférence, les polypeptides selon l'invention comprenant une  
35 ou plusieurs additions, délétions, substitutions d'au moins un acide aminé

conservent leur capacité à catalyser la coupure du premier résidu glucose du *N*-glycane précurseur de structure (Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>), qui peut être aisément déterminée par l'homme du métier, par exemple en utilisant les techniques décrites par Sambrook et al., (1989).

5 Selon un autre mode préférentiel de réalisation, les polypeptides selon l'invention comprenant une ou plusieurs additions, délétions, substitutions d'au moins un acide aminé conservent leur capacité à être reconnus par des anticorps dirigés contre le polypeptide ATGCS1 de séquence SEQ ID N°1.

10 L'invention est également relative à un acide nucléique codant pour un polypeptide tel que défini ci-dessus.

Un polypeptide dérivé de la protéine ATGCS1 est utile notamment pour la préparation d'anticorps destinés à la détection de la présence de ce polypeptide ou encore d'un fragment peptidique de ce dernier dans un  
15 échantillon.

Outre la détection de la présence du polypeptide ATGCS1 ou encore d'un fragment peptidique de ce dernier dans un échantillon, des anticorps dirigés contre ces polypeptides sont utilisés pour quantifier la synthèse de glucosidase I, par exemple dans les cellules d'une plante, et  
20 déterminer ainsi la capacité de cette plante à synthétiser des glycannes mûres au niveau des sites de glycosylation produits par les cellules de ladite plante.

Des anticorps préférés selon l'invention sont les anticorps reconnaissant spécifiquement la séquence d'acides aminés allant de l'acide aminé en position 1 à l'acide aminé en position 38 ( région hydrophile N-terminale) de la séquence du polypeptide ATGCS1 de séquence SEQ ID  
25 N°1.

Une seconde classe d'anticorps préférés selon l'invention sont les anticorps reconnaissant spécifiquement la séquence d'acides aminés allant de l'acide aminé en position 39 à l'acide aminé en position 67 (domaine transmembranaire) de la séquence du polypeptide ATGCS1 de SEQ ID N°1.  
30

Une troisième classe d'anticorps préférés selon l'invention sont les anticorps reconnaissant spécifiquement la séquence d'acides aminés allant de l'acide aminé en position 68 à l'acide aminé en position 852 (région



hydrophile comprenant le site catalytique) du polypeptide ATGCS1 de séquence SEQ ID N°1.

Une quatrième classe d'anticorps préférés selon l'invention sont les anticorps reconnaissant spécifiquement le site de fixation au glycanne de la protéine ATGCS1, et plus particulièrement ceux reconnaissant un peptide de séquence « ERHVDLRCW ».

Par " anticorps " au sens de la présente invention, on entendra notamment des anticorps polyclonaux ou monoclonaux ou des fragments (par exemple des fragments F(ab)'<sub>2</sub>, F(ab) ou encore tout polypeptide comprenant un domaine de l'anticorps initial reconnaissant le polypeptide ou le fragment de polypeptide cible selon l'invention.

Les anticorps monoclonaux peuvent être préparés à partir d'hybridomes selon la technique décrite par KOHLER et MILSTEIN (1975).

La présente invention concerne également des anticorps dirigés contre un polypeptide tel que décrit ci-dessus ou un fragment ou un variant de ce dernier, tel que produit dans la technique du triome ou encore la technique d'hybridome décrit par KOZBOR et al. (1983).

L'invention a également trait à des fragments d'anticorps simple chaîne Fv (ScFv) tels que décrits dans le brevet US N°4,946,768 ou encore par MARTINEAU et al. (1998).

Les anticorps selon l'invention comprennent également des fragments d'anticorps obtenus à l'aide de banques de phages (RIDDER et al., 1995), REINMANN K.A. et al., 1997).

Les préparations d'anticorps selon l'invention sont utiles dans des tests de détection immunologiques destinés à l'identification de la présence et/ou de la quantité de la glucosidase I selon l'invention ou encore d'un fragment peptidique de cette protéine, présent dans un échantillon.

Un anticorps selon l'invention pourra comprendre en outre un marqueur détectable isotopique ou non isotopique, par exemple fluorescent, ou encore être couplé à une molécule telle que la biotine, selon des techniques bien connues de l'homme du métier.

Ainsi, l'invention a en outre pour objet un procédé pour détecter la présence d'une glucosidase I végétale ou encore d'un fragment peptidique de l'un de ces polypeptides conformes à l'invention, dans un échantillon, ledit procédé comprenant les étapes consistant à :

a) mettre en contact l'échantillon à tester avec un anticorps tel que défini ci-dessus;

5           b) détecter le complexe antigène/anticorps formé.

L'invention est également relative à un nécessaire ou kit de diagnostic pour la détection de la présence d'un polypeptide conforme à l'invention dans un échantillon, ledit nécessaire comprenant:

10

a) un anticorps tel que défini ci-dessus;

b) le cas échéant, un réactif nécessaire à la détection du complexe antigène/anticorps formé.

15

L'invention est en outre illustrée, sans pour autant être limitée, par les figures et exemples suivants.

La figure 1 illustre des gels d'électrophorèse des protéines extraites des cellules de graines d'*Arabidopsis thaliana* de type sauvage (écotype sauvage Ws) et de cellules de graines écotype dans lesquelles le gène AtGCS1 a été interrompu par l'insertion d'une séquence de l'ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens* (M), provenant aussi de l'écotype Ws..

20

Le gel N°1 de gauche est un gel d'électrophorèse SDS-PAGE sur lequel les protéines ayant migré ont été colorées à l'aide du nitrate d'argent.

Le gel n°2 a été incubé en présence d'un anticorps anti-xylose.

25

Le gel n°3 a été incubé en présence d'un anticorps anti-fucose.

Le gel n°4 a été incubé en présence de concanavaline A.

30

**Figure 2.** Chromatogrammes HPAEC-PAD des N-glycannes libérés des graines sauvages (A) et du mutant *atgcs1* (B) par traitement à l'Endo H. Les nombres 5 à 9 réfèrent aux structures des N-glycans oligomannosidiques Man<sub>5</sub>GlcNAc à Man<sub>9</sub>GlcNAc représentées dans le Tableau I.

**Figure 3:** Spectres de masse MALDI-TOF des N-glycannes isolés des graines sauvages (Fig.3A) et des graines portant le gène *AtGCS1* muté (Fig 3B). En abscisse, valeur m/z représentant le rapport masse/charge.

35

**Exemple 1 : Isolement de l'ADNc codant pour la glucosidase I de *Arabidopsis thaliana***

**1. Extraction d'ARN de différents tissus végétaux**

Les ARN totaux de plantules âgées de 8 jours sont extraits grâce  
5 au kit RNeasy Plant Minikit de QUIAGEN (Allemagne), selon le protocole  
fourni par le fabricant. Une étape de dégradation de l'ADN a été réalisée  
systématiquement sur la colonne d'extraction (RNase free DNase, QUIAGEN,  
Allemagne), selon les instructions du fabricant. Toutes les manipulations  
sont effectuées avec du matériel exempt de Rnase et de l'eau DEPC est  
10 utilisée (0,1% de diéthyl pyrocarbonate autoclavé après une agitation de 12  
heures).

Des plantules âgées de 8 jours cultivées *in vitro* sont prélevées et  
directement mises dans de l'azote liquide et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ , jusqu'à  
l'extraction. Les pipettes et le matériel utilisé pour l'extraction des ARNs sont  
15 préalablement traités à la soude 0,4M pour détruire les éventuelles RNases.

L'eau est traitée au DEPC (1ml de DEPC dans 1l d'eau,  
homogénéisation toute la nuit sous une Sorbonne), puis autoclavée pour  
éliminer cet agent. Les centrifugations en colonne plus tube collecteur  
s'effectuent en centrifugeuse de type " Micro Centaure " (MSE, UK).

20 Le matériel végétal est broyé dans l'azote liquide, dans des  
Eppendorfs stériles à l'aide d'un broyeur électrique. Le broyat est  
immédiatement plongé dans l'azote liquide après broyage. L'extraction  
proprement dite s'effectue avec le kit " RNAeasy Plant Mini Extraction Kit ",  
(QUIAGEN, Allemagne). Brièvement, 450 $\mu\text{l}$  du tampon de lyse " RLT "  
25 additionné de  $\beta$ -mercaptoéthanol (10 $\mu\text{l}$ /1ml) sont vortexés avec 100 mg de  
tissus broyé.

Les étapes suivantes sont exactement celles décrites dans le manuel  
du kit fournit par QUIAGEN. Le lysat, placé dans une colonne et son tube  
collecteur de 2 ml, est centrifugé 2 min.

30 Le filtrat est récupéré et lavé avec 0,5 volume d'éthanol 96-100%.  
L'échantillon est ensuite déposé sur une colonne et son tube collecteur de 2  
ml pour être centrifugé 15 sec à 10.000 rpm, les ARNs sont retenus par la  
colonne. 350 $\mu\text{l}$  de tampon de lavage RW1 sont ajoutés sur cette colonne  
pour laver les ARNs par une centrifugation de 15sec à 10.000 rpm. Un

traitement à la DNase est ensuite effectué (10µl de Dnase et 70µl de tampon, QIAGEN) pendant 15min à température ambiante. Du tampon de lavage RW1 (350µl) est de nouveau appliqué pour terminer le lavage. La colonne est ensuite installée dans un nouveau tube collecteur de 2ml et  
5 deux lavages successifs sont effectués avec 500µl du tampon de lavage RPE additionné d'éthanol. Pour finir, les ARNs sont élués de la colonne par 30 à 50µl d'eau traitée au DEPC après une centrifugation 1min à 10.000rpm. Les ARNs sont conservé à -80°C.

## 10 2. PCR inverse (Reverse Transcriptase-PCR)

Les ADNc, simples brins, ainsi que les produits d'amplifications sont obtenus avec le système " Enhanced avian RT-PCR kit " (SIGMA, USA).

La rétrotranscription a lieu dans les conditions suivantes :

- 15 - 10µl de l'extraction d'ARN
- 1µl d'un mélange de déoxynucléotides
- 1µl d'oligonucléotide dT
- 4,5µl H<sub>2</sub>O (qsp 16,5µl)
- pendant 10min à 70°C, pour dénaturer les ARNs, y sont ensuite
- 20 ajoutés :
  - 2µl de tampon 10X AMV-RT
  - 1µl de l'enzyme Enhancer avian RT
  - 0,5µl d'inhibiteur de Rnase

Le mélange est incubé 15min à 25°C pour permettre l'hybridation de  
25 l'oligonucléotide dT, et ensuite la rétrotranscription se fait pendant 50min à 42°C. Les ADNc synthétisés sont ensuite amplifiés par PCR.

La réaction de PCR a été menée sur un thermocycleur (MJ Research PTC100 -96, Prolabo, France), dans des tubes de 0,2 ml (Prolabo, France)  
30 contenant le mélange suivant :

- 2µl /20µl du produit de la RT
- 5U d'enzyme *PfuTurbo*<sup>TM</sup> ADN Polymérase (Stratagène, USA)
- 10µl tampon 10x de la *Pfu*
- 4µl dNTP 5mM (GIBCO BRL, Ecosse)
- 35 - 2µl de chaque oligonucléotide 10µM (GENSET, France).

qsp 100 µl H<sub>2</sub>O

Des oligonucléotides spécifiques de AtGCS1 ont été choisis pour amplifier la séquence codante. Il s'agit de "ATG" (5'ATGACCGGAGCTAGCCGTCG) et "F0" (5'AAGTTTCGTTCCCGAAGAGG), se situant respectivement sur l'ATG putatif et à 30 pb en aval du stop putatif de T1F15.4.

La réaction a été effectuée dans les conditions suivantes :

- 10 1 étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min  
puis 35 cycles, chaque cycle étant composé des étapes suivantes :
  - 94°C : 30 sec
  - 60°C : 1 min
  - 72°C : 3 min
- 15 - une étape élongation à 72°C pendant 10 min

#### **EXEMPLE 2: Identification du gène AtGCS1**

L'identification du gène interrompu atgcs1 a été réalisée par l'isolement des bordures génomiques de l'ADN-T provenant de l'écotype de A. thaliana atgcs1 (mutant d'insertion), par la technique de « marche par PCR » (walk-PCT) décrite par Devic et al. (1997).

Les séquences des fragments d'ADN ainsi clonés ont été comparées à celles contenues dans les bases de données. Ces séquences présentent une similarité très forte avec la séquence du bac T1F15 issue de la banque d'ADN d'*Arabidopsis thaliana* TAMU et répertoriée dans la base de données Gen Bank sous la référence AC004393.

L'insert d'ADN d'*Arabidopsis thaliana* contenu dans le bac T1F15 est une portion du chromosome 1 et a été cartographié comme se situant entre les positions cM98 et cM99 du chromosome 1, c'est-à-dire sur une région du chromosome 1 à l'extrémité opposée du centromère.

Une seconde similarité assez forte d'environ 66% d'identité en nucléotides a également été identifiée avec l'insert d'ADN d'*Arabidopsis thaliana* contenu dans le BAC F316 de la banque IGF. L'insert du bac F316 a

également été cartographié sur le chromosome 1, entre les positions cM30 et cM40.

La structure exacte introns/exons du gène *Atgcs1* a pu être établie par alignement de la séquence de l'ADNc avec celle du clone génomique répertorié dans la base de données Gen Bank sous la référence AC004393. Des différences sont à noter par rapport à la séquence codante prédite du gène T1F15.4 dans les bases de données. Le gène *Atgcs1* présente en fait 22 exons et 21 introns. Les exons n°4 et 16 ont été ajoutés et les exons n°5, 6, 15 et 17 raccourcis par rapport aux prédictions de la base. Les sites d'épissages AG en fin d'intron et GT au début sont à chaque fois retrouvés, sauf pour le neuvième intron qui commence par GC. Il existe également quelques différences ponctuelles. Elles peuvent être dues à la différence d'écotypes utilisés pour réaliser la banque BAC (Columbia) et ou pour amplifier l'ADNc (Wassilevskija).

15

**Exemple 3 : Analyse de la structure de la glucosidase I de *Arabidopsis thaliana* codée par le gène *AtGCS1*.**

**1. Similarités de séquences avec d'autres glucosidases réelles ou putatives.**

La protéine AtGCS1 a une taille de 852 acides aminés et une masse moléculaire estimée de 97,5 kDa. Ceci correspond bien aux données de la bibliographie, les glucosidases I purifiées jusqu'à maintenant ayant une masse moléculaire comprise entre 85 et 95 kDa. (Pukazhenthil *et al.*, 1993) A partir de cette nouvelle séquence protéique, les recherches sur les bases de données ont été approfondies. Le tableau ci-dessous présente la similarité entre les protéines AtGCS1 et les glucosidases I déjà caractérisées.

	AtGCS1 identifié	AtGCS1 similarité
Homme (activité montrée)	38	54
Souris (gène cloné)	38	55
	38	55
C.elegans (putative)	36	53
S.pombe (putative)	31	45

Les pourcentages d'identité (38 %) et de similarité (54 %) obtenus entre la séquence d' AtGCS1 et la protéine humaine sont insuffisants pour conclure à l'activité glucosidase I de AtGCS1. Les pourcentages d'identité et de similarité ont été obtenus à l'aide du logiciel DNA STRIDER™ 1.3.

## 2. Comparaison avec des fragments peptidiques d'une glucosidase I végétale purifiée

La glucosidase I de plantules de haricot (*Vigna radiata*, Zeng et Albein, 1998), a été purifiée et le séquençage de quatre peptides a été effectué. Les séquences de ces quatre peptides s'alignent sur la séquence protéique de ATGCS1 et de la glucosidase I de l'homme.

15

peptide 1    NYQQSGFLWEQYDQIK ATGCS1 810 NYYETGYIWEQYDQVK HOMME 800 QYQATGFLWEQYSDRD	peptide3    DFG.QVLVDIGM ATGCS1 168 DYGRQELVENDM HOMME 155 SFGRQHIQDGAL
peptide 2    SLLWTNYGLR ATGCS1 741 SILWSDYGLV HOMME 719 RHLWSPFGLR	peptide4    EDIGDWQLRFK ATGCS1 253 EDVGDWQIHLK HOMME 178 QHGGDWSWRVT

Le peptide 1 identifié chez le haricot permet de retrouver dans les banques de données la séquence homologue chez *Arabidopsis*. Cependant ces données seules ne suffisent pas pour démontrer que le gène ainsi identifié (T1F15.4) code pour l'homologue fonctionnel de la glucosidase I de haricot. Cette donnée est du même niveau que les indications des bases de données sur T1F15.4 (gène putatif), qui par ailleurs ne permettent pas d'obtenir la séquence codante vraie.

### 3. Motif de rétention dans le reticulum endoplasmique

La glucosidase I est une protéine membranaire de type II (l'extrémité C-terminale se trouve dans le lumen), et devrait posséder, comme les protéines situées dans le lumen, un signal consensus de rétention dans le RE du type : deux arginines dans les premiers AA en N-Term (Shütze *et al.*, 1994). La séquence protéique N-terminale (MTGASRR), présente deux arginines dans les premiers acides aminés. (pour l'homme, la séquence commence par : MARGER).

### 4. Profil d'hydrophobicité

Une zone hydrophile s'étend des résidus 1 à 38, ce qui pourrait correspondre au domaine cytoplasmique de la protéine humaine (1 à 39). Ensuite un domaine hydrophobe s'étend jusqu'à l'aa 67, ce qui correspond au domaine transmembranaire de la protéine humaine (39 à 5). Le reste de la protéine est plutôt hydrophile, c'est la partie se trouvant probablement dans le lumen.

### 5. Site de N-glycosylation

Les glucosidases I caractérisées au niveau biochimique présentent toutes un site unique de N-glycosylation, que l'on retrouve en position équivalente dans la protéine humaine (NHT 657-659), et dans la protéine d'*Arabidopsis* (NHT 662-664).

### 6. Site de fixation au substrat

Le site de fixation au glycanne a été décrit dans la protéine humaine comme étant le peptide ERHLDLRCW (Romaniouk et Vijay, 1997). Ce peptide se situe en position 594. Dans la protéine ATGCS1, on trouve un peptide similaire (ERHVDLRCW) en position 598.



**EXEMPLE 4: Analyse cytologique sur les tissus et les graines des plantes d'*Arabidopsis thaliana* dont le gène *AtGCS1* est interrompu par l'ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*.**

5

Des observations préliminaires ont montré que, jusqu'au stade coeur de l'embryon, on ne peut pas observer de différences phénotypiques entre les graines. Puis les embryons sauvages et hétérozygotes (qui sont identiques) se différencient et continuent leur développement, alors que la

10 plante homozygote pour la mutation sur le gène *Atgcs1* reste au stade coeur et augmente de volume. La plante mutée ne se différencie absolument pas, son hypocotyle est très réduit, ses cotylédons et sa racine ne sont pas allongés. Les coupes réalisées au cours du développement de l'embryon chez la plante mutante montrent que l'albumen se cellularise normalement.

15 Les cellules paraissent plus grosses et moins nombreuses que celles de la plante sauvage d'un âge identique, surtout au niveau de la couche la plus externe, le protoderme. Chez l'embryon homozygote mature, on peut distinguer des faisceaux vasculaires dans l'hypocotyle réduit et un petit méristème apical. L'épiderme est très altéré, les cellules sont énormes et

20 présentent des espaces "vides". La racine semble très peu développée, elle n'est absolument pas différenciée.

Une approche en microscopie électronique à transmission a permis de mieux visualiser la désorganisation des cellules du mutant homozygote. Les observations ont été effectuées dans les cotylédons et dans le

25 protoderme. Les corps protéiques, chez la plante sauvage, non mutée ont des structures organisées, circulaires et présentant des zones peu denses. On peut en visualiser de 2 à 5 par cellules. Les corps lipidiques remplissent toute la cellule, un noyau peut être observé dans chaque cellule. Chez la

30 plante mutante, les corps lipidiques ne sont pas altérés, ils sont présents en grand nombre et remplissent la quasi-totalité de la cellule. Les corps protéiques, par contre, sont altérés. Ils ne sont pas présents dans toutes les cellules, et lorsqu'on peut en observer un, il n'est pas circulaire et entoure généralement une vacuole. Dans chaque cellule se trouvent une ou

35 plusieurs vacuoles, au contenu plus ou moins dense, ce qui ne s'observe jamais chez la plante non mutée sauvage.

**EXEMPLE 5: Analyse biochimique: mise en évidence de l'absence d'activité glucosidase 1 dans les graines de la plante mutée sur le gène *Atgcs1*.**

5                   **5.1. Matériels et Méthodes.**

Les méthodes utilisées sont décrites dans Fichette-Lainé et al., (1998) Methods in Biotechnology 3 :271-290.

10       **Electrophorèse des protéines**

L'extraction et le transfert des protéines du gel d'électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, BA 85, 0,45 µm) est effectué selon la technique décrite par Towbin et al. (1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4350-4354). Pendant l'électrophorèse, le matériel utilisé pour le transfert (membrane de nitrocellulose, papier Whatmann 3 MM, scotch brite) est équilibré 15 à 30 min dans le tampon de transfert (Tris 25 mM; glycine 120 mM ; méthanol 10%). A la fin de l'électrophorèse, la cassette de transfert est disposée dans une cuve de transfert contenant 600 ml du tampon décrit ci-dessus. Un transfert satisfaisant des protéines du gel d'électrophorèse sur la membrane de nitrocellulose est obtenu en 2 h sous un champ électrophorétique de 10 V.cm<sup>-1</sup>. Un contrôle d'efficacité du transfert est réalisé par une coloration réversible de la membrane de nitrocellulose au rouge Ponceau S (1% (p/v) dans TCA 3%). La décoloration de la membrane de nitrocellulose après le traitement au rouge Ponceau S est obtenue après rinçage avec un tampon TBS (NaCl 500 mM; Tris-HCl 20 mM, pH 7,4). Toutes ces étapes de traitement de la membrane de nitrocellulose, appelée empreinte après le transfert, sont effectuées sous agitation douce à température ambiante.

30

**Immunodetection**

Une fois la membrane équilibrée dans le TBS, les sites de couplage de la nitrocellulose encore disponibles après le transfert des protéines sont saturés par une incubation d'une heure dans une solution de saturation

35

(gélatine 3% dissoute dans le tampon TBS). Après saturation de la membrane, l'immunodétection des protéines est réalisée. L'empreinte est incubée pendant 90 min en présence d'un immunosérum polyclonal de lapin dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans une solution de gélatine à 1% (p/v) dans le tampon TBS. Après cette incubation, les anticorps non fixés sont éliminés par une série de 4 lavages de 15 min dans du tampon TTBS (Tampon TBS + 0.1% Tween 20). L'empreinte est ensuite soumise à une incubation en présence d'un second anticorps couplé à la peroxydase de raifort (IgG de chèvre, anti-IgG de lapin, couplée à la peroxydase de raifort, Bio-Rad). Ce second anticorps est dilué au 1/3000<sup>ème</sup> dans une solution de gélatine à 1% (p/v) dans le tampon TBS pendant 90 min. L'excès de second anticorps conjugué est éliminé par 4 lavages de 15 min dans du tampon TTBS. Le Tween 20 est éliminé à la fin du traitement par un lavage de 15 min de l'empreinte dans le tampon TBS. Les protéines reconnues par les immunoglobulines IgG de lapin sont révélées par incubation de la membrane dans un mélange contenant 30 mg de 4-chloro-1-naphtol (HRP color reagent, Bio-Rad) dissous dans 10 mL de méthanol et additionné de 50 ml de tampon TBS contenant 30 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%.

20

#### Affinodétection des protéines sur membrane par la concanavaline A.

La concanavaline A (ConA) est une lectine de graine de légumineuse *Canavalia ensiformis* qui reconnaît spécifiquement les résidus mannoses β-liés des glycanes oligomannosidiques associés aux protéines et également la peroxydase. Une fois la membrane équilibrée dans le TBS, les sites de couplage de la nitrocellulose encore disponibles après le transfert sont saturés par une incubation d'une heure minimum dans du tampon TTBS. La membrane est alors incubée pendant 90 min dans du tampon TTBS additionné de sels (CaCl<sub>2</sub> 1 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM) permettant l'activation de la lectine et contenant 25 µg.mL<sup>-1</sup> de ConA (Sigma). Après cette incubation, la membrane est lavée par 4 bains de 15 min dans du TTBS complétement en sels, afin d'éliminer la ConA non fixée ou fixée sur des sites non spécifiques. La membrane est ensuite incubée pendant 60 min dans du TTBS complétement en sels en présence de 50 µg.mL<sup>-1</sup> de peroxydase de raifort.

L'excès de peroxydase est éliminé par 4 lavages successifs de 15 min dans du TTBS complété en sels. Un lavage de l'empreinte dans du tampon TBS additionné de sels permet l'élimination du Tween 20. La révélation de l'activité peroxidase est réalisée comme décrit pour l'immunoétection.

5

## **5.2. Résultats**

L'analyse de la N-glycosylation des protéines des graines homozygotes a été réalisée et les résultats obtenus sont présentés à la figure 1.

10

La détection des précurseurs: les N-glycannes, a été réalisée par la concanavaline A: c'est une lectine qui se lie spécifiquement aux glycannes non matures. De nombreuses bandes supplémentaires apparaissent chez le mutant, il y a donc une forte accumulation des précurseurs. La détection des oligosaccharides complexes est réalisée à l'aide d'anticorps anti-xylose et anti-fucose; toutes les bandes disparaissent chez le mutant, il n'y a aucun N-glycane complexe. La plante mutée est donc bien affectée dans la maturation des N-glycannes, au niveau de la glucosidase 1.

15

Les résultats ci-dessus illustrent bien que le mutant *Atgcs1* est incapable de catalyser la réaction d'addition d'un résidu xylose en position  $\beta$  1-2 ou d'un résidu fucose en position  $\alpha$  1-3 sur les glycannes des glycoprotéines qu'il produit.

20

De plus, le profil des glycoprotéines présentant les glycannes de type oligomannosidique (empreinte 4) est fortement modifié chez le mutant.

## **Exemple 6 : Analyse des glycannes fixés sur les protéines synthétisées chez des plantes mutées sur le gène *AtGCS1*.**

25

### **6.1 Matériels et Méthodes**

#### ***Préparation des N-glycannes à partir des graines d'*Arabidopsis thaliana* :***

30

Des extraits protéiques bruts ont été obtenus par broyage de 100mg de graines d'*A. thaliana* dans 10 mL de tampon 50 mM Hepes, pH 7,5 contenant 2 mM de bisulfite de sodium et 0,1 % de SDS. Le matériel insoluble a été éliminé par centrifugation puis les protéines ont été précipitées par addition de deux volumes d'éthanol à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Le culot a

35

ensuite été chauffé pendant 3 min dans 2 mL de tampon Tris HCl 50 mM pH 7,5 contenant 0,1 % de SDS. Après refroidissement de la solution, 0,1 U d'Endo H a été ajouté et la solution a été incubée pendant 18 h à 37°C. Les N-glycannes ont été ensuite purifiés par éluions successives sur colonnes  
5 C18 (Bond Elut), d'AG 50W-X2 et de carbograph comme décrit précédemment dans la littérature (Bardor *et al.*, 1999).

### **Chromatographie HPAE-PAD**

Les chromatographies HPAE-PAD ont été réalisées sur un appareil Dionex DX500 équipé d'un système de pompage GP50, d'un détecteur  
10 ED40 et d'une colonne Carbowac PA1 (4,6x250 mm). Les N-glycannes ont été élués au moyen d'un gradient linéaire de 60 min allant de 0 à 200 mM d'acétate de sodium dans de la soude 100 mM.

### **Spectrométrie de masse MALDI-TOF**

15 Les spectre de masse MALDI-TOF ont été enregistrés sur un appareil Micromass ToF spec E. Les spectres ont été réalisés en mode positif et réflectron avec un voltage d'accélération de 20 kV, une pression de  $10^{-7}$  mbars dans la source et de  $10^{-6}$  mbars dans l'analyseur. Le laser à azote a été réglé à 337 nm avec une durée d'impulsion de 4 ns. L'appareil a été  
20 calibré avec la substance P (1347,7 Da) et l'hormone adrénocorticotropique humaine (2465,2 Da). La solution contenant l'échantillon a été préparée à une concentration approximative de  $10 \text{ pmole} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  dans l'eau. Deux  $\mu\text{L}$  de cette solution ont été dissous dans le même volume d'une solution de matrice obtenue par dissolution de 2 mg d'acide 5, 5-dihydroxybenzoïque  
25 dans 200  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile à 70% contenant 0,1 % de TFA. Le mélange échantillon matrice a ensuite été homogénéisé puis déposé sur la cible et séché sous vide.

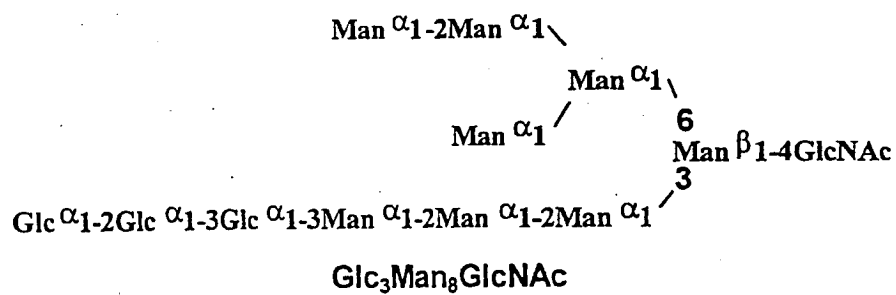
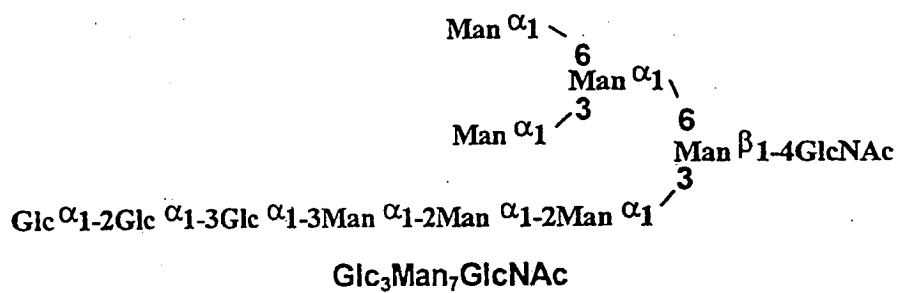
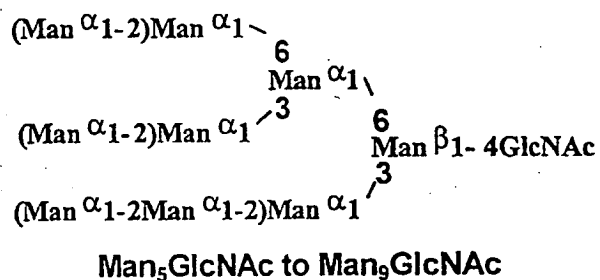
**Abréviations :** Endo H, endoglycosidase F/ HPAEC-PAD, High pH Anion  
30 Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection/ MALDI-TOF, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/

## 6.2 Résultats

Les N-glycannes ont été libérés des extraits protéiques de graines par traitement à l'Endo H. Cette endoglycosidase clive spécifiquement la  
5 liaison glycosidique entre les deux GlcNAc de l'unité chitobiose des N-glycannes oligomannosidiques. Le profil chromatographique HPAE-PAD des N-glycannes libérés des graines sauvages (Figure 2A) présente six pics majeurs. Ces pics ont été attribués aux structures  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$  à  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$  (voir Tableau I) par comparaison de leurs temps de rétention  
10 avec des structures standards comme précédemment décrit dans la littérature (Rayon *et al.*, 1996). Ces structures oligomannosidiques ont été précédemment caractérisées à partir de plantes d'*Arabidopsis sauvages* par Rayon *et al.* (1999). Les structures de ces composés ont pu être confirmées par analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 3A). Le spectre  
15 présente cinq ions ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) à  $m/z= 1054, 1216, 1378, 1540$  et  $1702$  correspondant aux masses attendues pour les adduits sodiques des oligosaccharides  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$  to  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ .

Les N-glycannes associés aux protéines des graines mutantes ont été analysés selon le même principe à partir du mélange de graines  
20 homozygotes et hétérozygotes. Le profil HPAE-PAD (Figure 2B) montre un ensemble de pics entre 16 et 22 min, analogues à ceux détectés à partir des graines sauvages (Figure 2A). Ces pics ont été attribués aux N-glycannes oligomannosidiques  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}$  à  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ . En addition des ces structures, un pic à 29 min a été détecté. La nature du ou des  
25 oligosaccharide(s) contenu(s) dans ce pic a d'abord été étudiée par comparaison de son temps de rétention en HPAE-PAD avec des composés de structures connues. Il a été établi (non illustré) que le pic élué à 29 min présente le même temps de rétention que la structure  $\text{Glc}_3\text{Man}_7\text{GlcNAc}$  (Tableau I) isolée au laboratoire lors d'une précédente étude sur l'effet de la  
30 castanospermine, inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase I, sur la maturation des N-glycannes dans des cultures cellulaires de sycamore (Lerouge *et al.*, 1996). Le spectre MALDI-TOF des N-glycannes isolés des graines mutantes (Figure 3B) montre également la présence de structures supplémentaires à celles identifiées à partir des graines sauvages. En addition des ions  
35 ( $\text{M}+\text{Na}^+$ ) à  $m/z= 1054, 1216, 1378, 1540$  et  $1702$  correspondant aux espèces

Man<sub>5</sub>GlcNAc à Man<sub>9</sub>GlcNAc, deux ions à  $m/z = 1864$  et  $2026$  ont été détectés. Ces ions moléculaires correspondent à des structures ayant un et deux hexoses supplémentaires. Afin de confirmer que ces deux ions sont attribuables au pic supplémentaire observé dans le profil présenté dans la figure 2B, ce pic a été collecté, désallé sur colonne carbograph (Parker *et al.*, 1998) puis analysé en spectrométrie MALDI-TOF. Seuls les ions à  $m/z = 1864$  et  $2026$  ont été détectés confirmant ainsi que le pic chromatographique à 29 min (Figure 2B) résulte de la coélution de deux oligosaccharides constitués d'un résidu N-acétylglucosamine et de respectivement dix et onze résidus hexose. Ces données nous permettent de proposer que chez les graines mutantes, deux oligosaccharides, non observés dans les graines sauvages, soient accumulés et présentent les structures Glc<sub>3</sub>Man<sub>7</sub>GlcNAc et Glc<sub>3</sub>Man<sub>8</sub>GlcNAc (Tableau I). La première structure a précédemment été caractérisée à partir de cellules de sycamore après traitement par la castanospermine (Lerouge *et al.*, 1996), la seconde structure porte un résidu mannose supplémentaire résultant probablement de l'action partielle de l' $\alpha$ -mannosidase I au niveau de l'appareil de Golgi.



**Tableau I: Structures et désignations des oligosaccharides**



### Références Bibliographiques

- **ALTSCHUL, S.F., Gish, W, Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.** 1990.  
Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.
- 5 • **ALTSCHUL S.F et al.,** (1997), Nucleic Acids Research, vol.25:33896-3402.
- **AUSUBEL et al.,** (1989), Current Protocols in Molecular Biology, Green  
Publishing Associates and WILEY Interscience, New-York.
- 10 • **BAUSE, E. SCHWEDEN, J., GROSS, A. AND ORTHEN, B.** (1989)  
Purification and characterization of trimming glucosidase 1 from pig liver.  
Eur. J. Biochem. 183:661-669.
- 15 • **BAUSE, E., ERKENS, R., SCHWEDEN, J. AND JAENIK, L.** (1986)  
Purification and characterization of trimming glucosidase 1 from  
*Saccharomyces cerevisiae*. FEBS 206(2):206-212.
- **BECHTOLD, N. ELLIS, J. PELLETIER , G.** (1993). In planta  
20 *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis*  
*thaliana* plants, C.R. Acad. Sci. Paris, 316: 1194-1199.
- **BOUCHEZ, D. CAMILLERI, C. CABOCHE, M.** (1993). A binary vector  
based on Basta resistance for in planta transformation of *Arabidopsis*  
25 *thaliana*. C.R. Acad. Sci. Paris. 316: 1188-1193.
- **BEAUCAGE et al.,** (1981), Tetrahedron Lett., vol.22:1859-1862
- **BROWN EL. et al.,** (1979) Methods Enzymol., 68: 109-151.
- 30 • **BEVAN et al.,** (1984) Nucleic Acids Research, 12: 8711-8721.
- **BOUCHEZ et al.,** 1993, C.R. Acad. Sci. Paris, Science de la Vie/Life  
Sciences, 316:1188-1193.

- BARDOR M., LOUTELIER-BOURHIS C., MARVIN L., CABANES-MACHETEAU M, LANGE C., LEROUGE P. AND FAYE L. (1999) Analysis of plant glycoproteins by Matrix-Assisted Laser Desorption ionization Mass Spectrometry : Application to the N-glycosylation analysis of bean phytohemagglutinin. *Plant Physiol. Biochem.*, **37**, 319-325.  
5
- CHO R.J. et al. (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.95 (7):3752
- CORMACK B , VALDIVIA R.H. FALKOW S. 1996. *Gene* 173, 33-38.  
10
- CHRISPEELS, M. ET FAYE, L. (1998) Rien ne sert de produire, il faut glycosyler. *Biofutur*, 184: 53-57.
- DEVIC, M. ALBERT, S. DELSENY, M., ROSCOE, J. (1997). Efficient PCR walking on plant genomic DNA. *Plant Physiol. Biochem.* 35 (4): 331-339.  
15
- FULLER S.A. et al. (1996), *Immunology in Current Protocols in Molecular Biology*.
- JEFFERSON R.A., KAVANACH, T.A., and BEVAN , M.W. (1987). *Embo J.* 3901-3907.  
20
- FICHETTE-LAINE et al., 1998, *Methods in Biotechnology*, 3:271-290
- GREEN et al. ,(1986) , *Ann. Rev. Biochem.*, vol.55: 569-597.  
25
- GRIFFIN et al. (1989), *Science*, vol.245:967-971.
- GARCIA-CASADO, G. SANCHEZ-MONGE, R. CHRISPEELS, M. ARMANTIA, A., SALCEDO, G. AND GOMEZ, L. (1996) Role of complex asparagine-linked glycans in the allergenicity of plant glycoprotein. *Glycobiology*, 6(4): 471-477.  
30
- GOMORD, V., FICHETTE-LAINE, A-C., DENMAT, L-A., MICHAUD, D. AND FAYE, L. (1998) Production of Foreign Proteins in Tobacco Cell  
35

Suspension Culture. Methods in Biotechnology. Cunningham, C and Porter, A (Eds) Humana Press Inc, Totwa, NJ. 3 : 15.

- 5    • **HAMES B.D. and HIGGINS S.J.**, (1985), Nucleic Acid Hybridization: The Practical Approach , HANES and HIGGINS Ed., IRL Press, Oxford.
- **HAQ, T., MANSON, H., CLEMENTS, J. AND ARNTZEN, C.** (1995) Oral Immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. Science, 268 (5211): 714-716.
- 10   • **HETTKAMP, H., LEGLER, G. AND BAUSE, E.** (1984). Purification by affinity chromatography of glucosidase 1, an endoplasmic reticulum hydrolase involved in the processing of asparagine-linked oligosaccharides. Eur. J. Biochem. 142(1): 85-90.
- 15   • **HOHN AND PUCHTA**, 1999, Gene Therapy in Plant, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:8321-8323
- **HOUBEN WEYL**, (1974), In Methodes Organischen Chemie, E.Wunsch Ed. vol.15-I et 15-II, Thieme, Stuttgart.
- 20   • **HORSCH et al.**, (1984).
- **IZANT JJ, WEINTRAUB H.**, (1984), Cell, Vol.36 (4):1007-1015
- **KOCH Y.** (1977), Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol.74:488-491.
- 25   • **KOHLER G. and MILSTEIN C.**, (1975) Nature, vol.256:495.
- **KOZBOR et al.** (1983), Hybridoma, vol.2 (1): 7-16.
- 30   • **KALZ-FÜLLER, B., BIEBERICH, E. AND BAUSE, E.** (1995). Cloning and expression of glucosidase 1 from human hippocampus. Eur. J. Biochem 231: 344-351.
- 35   • **KHAN, F., Varma, G. and Vijay, I.** (1999). Genomic organisation and promoter activity of glucosidase 1 gene. Glycobiology, 9 (8): 797-806.

- LEROUGE, P., CABANES-MACHETEAU, M., RAYON, C., FISCHETTE-LAINE, A-C, GOMORD, V. AND FAYE, L. (1998) N-Glycoprotein biosynthesis in plants :recent developments and future trends. Plant Molecular Biology, 38 : 31-48.  
5
- LEROUGE P., FITCHETTE-LAINE A.C., CHEKKAFI A., AVIDGOR V. AND FAYE L. (1996). Castanospermine inhibits the processing of N-glycans in sycamore cells without affecting the secretion of glycoproteins.  
10 *Plant J.*, 10, 713-719.
- MARTINEAU et al. , JOHNS P. WINTER G.(1998), J. Mol. Biol., vol.280 (1):117-127.
- 15 • MERRIFIELD RB, (1965a), Nature, vol.207 (1996: 522 -523)
- MERRIFIELD R.B., (1965b), Science, vol.150 (693): 178-185.
- MYLNE, J., and BOTELLA, J., R. (1998). Binary vectors for sense and antisense expression of Arabidopsis ESTs. Plant Molecular. Biology Reporter 16, p257-262.  
20
- McELROY D., ZHANG W, CAO J, WU R (1990) Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. Plant Cell 2, p 163-171.
- 25 • MANSFIELD, S. AND BRIARTY, L. 1991, Early embryogenesis in Arabidopsis thaliana II. The Developing embryo; Can. J. Biol., 69: 461-476.
- 30 • MURRAY ET AL. 1987, Lectin-specific targeting of lysosomal enzymes to reticuloendothelial cells. Methods Enzymol; 149: 25-42.
- NARANG S.A. et al., (1979), Methods Enzymol., vol.68, 90-98.

- ODELL JT, NAGY F. CHUA NH. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313, p. 810-812.
- 5 • PALACPAC, N., Yoshida, S. Sakai, H., Kimura, Y., Fujiyama, K. Yoshid, T. and Seki, T. (1999) Stable expression of human  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase in plant cell modified N-linked glycosylation patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 4692-4697.
- 10 • PACKER H. N., MARGARET A. L., JARDINE D. R., REDMOND J. W. (1998) A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins, *Glycoconjugate J.*, 15, 563-570.
- PUKAZHENTHI, B., VARMA, G. AND VIJAY, I. (1993) Conserved  
15 structural features in glycoprotein processing glucosidase 1 from several tissues and species. *Indian J Biochem Biophys.* 30(6):333-40.
- ROSSI et al. (1991), *Pharmacol. Ther.*, vol.50:245-254
- 20 • RIDDER R. et al., (1995), *Biotechnology (NY)*, vol.13 (3): 255-260 ou encore des anticorps humanisés
- REINMANN K.A. et al., (1997), *Aids, Res. Hum. Retroviruses*, vol.13 (11):933-943
- 25 • RAYON R., GOMORD V., FAYE L., LEROUGE P. (1996). N-glycosylation of phytohemagglutinin expressed in bean cotyledons or in transgenic tobacco plants, *Plant Physiol. Biochem.*, 34, 273-281.
- 30 • RAYON C., CABANES-MACHETEAU M., LOUTELIER-BOURHIS C., SALIOT-MAIRE I., LEMOINE J., REITER W.D., LEROUGE P. AND FAYE L. (1999) Characterization of N-glycans from *Arabidopsis thaliana*. Application to a fucose-deficient mutant. *Plant Physiol.*, 119, 725-733.

- ROMANIOUK, A. AND VIJAY, I. (1997) Structure-function relationships in glucosidase I: amino-acids invoved in binding the substrate to the enzyme. *Glycobiology*. 7(3) 399-404.
- 5 • SHAILUBHAI, K. PRATTA, M. AND VIJAY, I (1987). Purification and characterization of glucosidase 1 involved in N-linked glycoprotein processing in bovine mammary gland. *Biochem. J.* 247 (3): 555-562.
- 10 • SHAILUBHAI, K. PUKAZHENTI, B. SEXENA, E., VARMA, G. AND VIJAY, I. (1991) Glucosidase 1, a transmembrane endoplasmic reticular glycoprotein with a luminal catalytic domain. *J. Biol. Chem.* 266(25): 16587-93.
- 15 • SAMBROOK J., FRITSCH E.F. and T. MANIATIS, (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ème ed.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NEW YORK.
- SCZAKIEL G. et al. (1995) *Trends. Microbiol.*, vol.3 (6):213-217.
- 20 • SANCHEZ-PESCADOR R., (1988), *J. Clin. Microbiol.* , vol.26(10):1934, 1938.
- 25 • SCHUTZE, M., PETERSON, P., AND JACKSON, M. (1994) An N-terminal double arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal* 13(7):1696-1705.
- SZUMILO, T. KAUSHAL, G. AND ELBEIN, A. (1986). Purification and properties of Glucosidase 1 from Mung Bean Seddlings. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (247): 261-271.
- 30 • URDEA NS et al. (1988) , *Nucleic Acids Research*, vol.11: 4937-4957.
- URDEA NS et al., (1991), *Nucleic Acids Symp. Ser.*, vol.24:197-200.
- 35 • WEIL, J.H. BONNET, J. BOULANGER, Y., CHAMBON, P. DUBERTET, G. GAUTHERON, D. KEDINGER, C., LADZUNSKI, M., MONTREUIL, J.,

PATTE, J.C., REBEL, G., ROSSIGNOL, J.M. ET WRIGHT, M. (1989)  
Biochimie Générale, 5ème édition. Eds Masson, PARIS.

• WABIKO H. et al., (1986), DBA, vol.5.(4): 305-314.

5 • WOO, S.-S, Jiang J., Gill, B.S., Paterson, A.H. and Wing, R.A. 1994.  
Nuc. Acid Res. 22, p 4922-4931.

• ZENG, Y-C. AND ELBEIN, A. (1998) Purification to homogeneity and  
properties of plant glucosidase I. Arch Biochem Biophys. 355(1) :26-34.

10

• .  
• ZENG ET AL, 1997 : ZENG Y, BANNON G, THOMAS V., RICE K.,  
DRAKE R AND ELBEIN, A. (1997) Purification and Specificity of 1,2-  
Xylosyltransferase, an Enzyme That Contributes to the Allergenicity of  
Some Plant Proteins. J. Biol. Chem. 272 (50) : 31340-31347.

## REVENDEICATIONS

1. Acide nucléique comprenant au moins 20 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide codant pour une glucosidase de type I de  
5 séquence en acides aminés SEQ ID N°1, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.
2. Acide nucléique selon la revendication 1, comprenant au moins 20 nucléotides consécutifs de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.
- 10 3. Acide nucléique selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il s'agit de la séquence nucléotidique SEQ ID N°2 ou de l'acide nucléique de séquence complémentaire.
4. Acide nucléique possédant au moins 80% d'identité en nucléotide avec un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 3.
- 15 5. Acide nucléique hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.
6. Acide nucléique selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une sonde oligonucléotidique.
- 20 7. Acide nucléique selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une amorce oligonucléotidique.
8. Acide nucléique selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les polynucléotides de séquences SEQ ID N°3 à SEQ ID N°15.
- 25 9. Séquence nucléotidique antisens comprenant au moins 20 nucléotides consécutifs d'un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.
10. Vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 5.
- 30 11. Vecteur recombinant selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il est un vecteur d'expression fonctionnel dans une cellule hôte végétale.
12. Vecteur recombinant selon l'une des revendications 9 et 10, caractérisé en ce qu'il est un vecteur d'origine fongique, bactérienne ou  
35 virale.



13. Cellule hôte transformée avec un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 5 et 9 ou avec un vecteur recombinant selon l'une des revendications 10 à 12.

14. Cellule hôte transformée selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule d'origine procaryote ou eucaryote.

15. Cellule hôte transformée selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule d'*Agrobacterium tumefaciens*.

16. Cellule hôte transformée selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule végétale.

17. Organisme multicellulaire végétal recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une cellule hôte transformée selon l'une des revendications 13 à 16.

18. Plante transformée avec un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 5 et 9 ou un vecteur recombinant selon l'une des revendications 10 à 12.

19. Plante transformée comprenant, sous une forme intégrée dans son génome, un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 5 et 9 ou un vecteur recombinant selon l'une des revendications 10 à 12.

20. Procédé d'obtention d'une plante transformée, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

a) obtention d'une cellule hôte transformée végétale selon l'une des revendications 13 ou 16;

b) régénération d'une plante entière à partir de la cellule hôte transformée obtenue à l'étape a);

c) sélection des plantes obtenues à l'étape b) ayant intégré un polynucléotide d'intérêt choisi parmi les acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 5 et 9.

21. Procédé d'obtention d'une plante transformée, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

a) obtention d'une cellule hôte d'*Agrobacterium tumefaciens* transformée selon la revendication 15;

b) transformation de la plante par infection avec des cellules d'*Agrobacterium tumefaciens* obtenues à l'étape a);

c) sélection des plantes ayant intégré un polynucléotide d'intérêt choisi parmi les acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 5 et 9.

22. Procédé d'obtention d'une plante transformée, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à:

a) transformer une cellule de plante avec un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 5 et 7 ou un vecteur recombinant selon l'une des revendications 10 à 12;

b) régénérer une plante entière à partir des cellules de plantes recombinantes obtenues à l'étape a);

c) sélectionner les plantes ayant intégré l'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 5 et 9 ou le vecteur recombinant selon l'une des revendications 10 à 12.

23. Procédé d'obtention d'une plante transformée selon l'une des revendications 20 à 22, caractérisé en ce qu'il comporte en outre les étapes de :

d) croisement entre elles de deux plantes transformées telles qu'obtenues à l'étape c);

e) sélection des plantes hétérozygotes pour l'acide nucléique d'intérêt.

24. Procédé d'obtention d'une plante transformée selon l'une des revendications 20 à 22, caractérisé en ce qu'il comprend en outre les étapes de :

d) croisement d'une plante transformée obtenue à l'étape c) avec une plante de la même espèce;

e) sélection des plantes issues du croisement de l'étape d) ayant conservé l'acide nucléique d'intérêt.

25. Plante transformée telle qu'obtenue selon l'une quelconque des revendications 20 à 24.

26. Semence d'une plante transformée selon l'une quelconque des revendications 18, 19 et 25.

27. Semence de plante dont une partie ou la totalité des cellules constitutives comprennent un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 5 et 9.

28. Utilisation d'un acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 5 pour l'expression *in vitro* ou *in vivo* d'une glucosidase l végétale.

29. Utilisation selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle implique une expression in vivo chez une plante transformée avec un tel acide nucléique.

30. Utilisation d'une séquence nucléotidique selon la revendication 9, ou d'un vecteur recombinant comprenant une séquence nucléotidique selon la revendication 9, pour inhiber ou pour bloquer l'expression du gène codant pour la glucosidase I d'*Arabidopsis thaliana*.

31. Procédé de détection d'un acide nucléique constitutif de l'ARN messager, de l'ADNc ou de l'ADN génomique du gène de la glucosidase 1 d'*Arabidopsis thaliana* dans un échantillon, comprenant les étapes consistant à:

a) mettre en contact une sonde ou une pluralité de sondes selon la revendication 6 avec l'acide nucléique susceptible d'être contenu dans l'échantillon;

b) détecter l'hybride éventuellement formé entre l'acide nucléique de l'échantillon et la ou les sondes.

32. Kit ou nécessaire de détection d'un acide nucléique constitutif de l'ARN messager, de l'ADNc ou de l'ADN génomique du gène de la glucosidase 1 d'*Arabidopsis thaliana* dans un échantillon, comprenant:

a) une sonde ou une pluralité de sondes selon la revendication 6;

b) le cas échéant, les réactifs nécessaires à la réaction d'hybridation.

33. Procédé pour amplifier un acide nucléique constitutif de l'ARN messager, de l'ADNc ou de l'ADN génomique du gène de la glucosidase 1 d'*Arabidopsis thaliana* dans un échantillon, comprenant les étapes consistant à :

a) mettre en contact un couple d'amorces selon l'une des revendications 7 et 8 avec l'acide nucléique susceptible d'être contenu dans l'échantillon;

b) réaliser au moins un cycle d'amplification de l'acide nucléique contenu dans l'échantillon;

c) détecter l'acide nucléique éventuellement amplifié.

34. Kit ou nécessaire pour l'amplification d'un acide nucléique constitutif de l'ARN messager, de l'ADNc ou de l'ADN génomique du gène de la glucosidase 1 d'*Arabidopsis thaliana* dans un échantillon, comprenant:

a) un couple d'amorces selon l'une des revendications 7 ou 8;  
b) le cas échéant, les réactifs nécessaires à la réalisation de la réaction d'amplification.

35. Polypeptide codé par un acide nucléique selon l'une  
5 quelconque des revendications 1 à 5.

36. Polypeptide selon la revendication 35, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence en acides aminés SEQ ID N°1 ou un polypeptide ayant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N°1, ou un fragment peptidique de ce polypeptide.

10 37. Polypeptide comprenant des modifications d'acides aminés de 1, 2, 3, 4, 5, 10 à 20 substitutions, additions ou délétions d'au moins un acide aminé par rapport à la séquence d'acides aminés d'un polypeptide selon l'une des revendications 35 ou 36.

15 38. Polypeptide comprenant au moins 7 acides aminés consécutifs d'un polypeptide selon l'une des revendications 35 à 37.

39. Acide nucléique codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 35 à 38.

40. Anticorps dirigé contre un polypeptide selon l'une des revendications 35 à 38.

20 41. Procédé pour détecter la présence d'un polypeptide selon l'une des revendications 35 à 38 dans un échantillon, comprenant les étapes consistant à :

a) mettre en contact l'échantillon avec un anticorps selon la revendication 40;

25 b) détecter le complexe antigène/anticorps éventuellement formé.

42. Kit ou nécessaire de diagnostic pour la détection de la présence d'un polypeptide selon l'une des revendications 35 à 38 dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend:

a) un anticorps selon la revendication 40;

30 b) le cas échéant, un réactif nécessaire à la détection du complexe antigène/anticorps éventuellement formé.

43. Kit ou nécessaire de diagnostic pour la détection de la présence d'un polypeptide selon l'une des revendications 35 à 38 dans un échantillon, caractérisé en ce qu'il comprend:

35 a) un anticorps selon la revendication 40;

b) le cas échéant, les réactifs nécessaires à la détection des complexes antigène/anticorps éventuellement formés.

44. Protéine à glycosylation modifiée, caractérisée en ce qu'elle est produite par une plante transformée selon l'une des revendications 18, 19 et 25, ou par une cellule hôte transformée selon l'une des revendications 13 et 16.

45. Protéine à glycosylation modifiée, caractérisée en ce qu'elle est contenue dans un semence de plante transformée selon l'une des revendications 26 ou 27.

46. Protéine à glycosylation modifiée selon l'une des revendications 44 et 45, caractérisée en ce qu'elle est une protéine recombinante.

47. Protéine à glycosylation modifiée selon la revendication 46, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un antigène ou d'un immunogène.

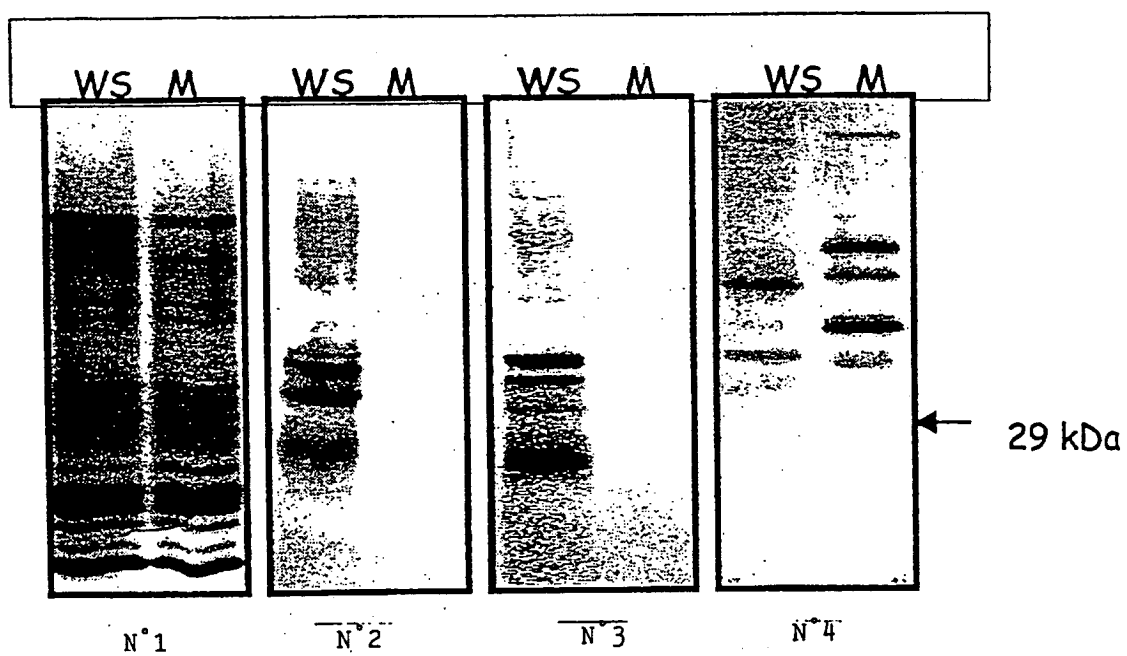


Figure 1

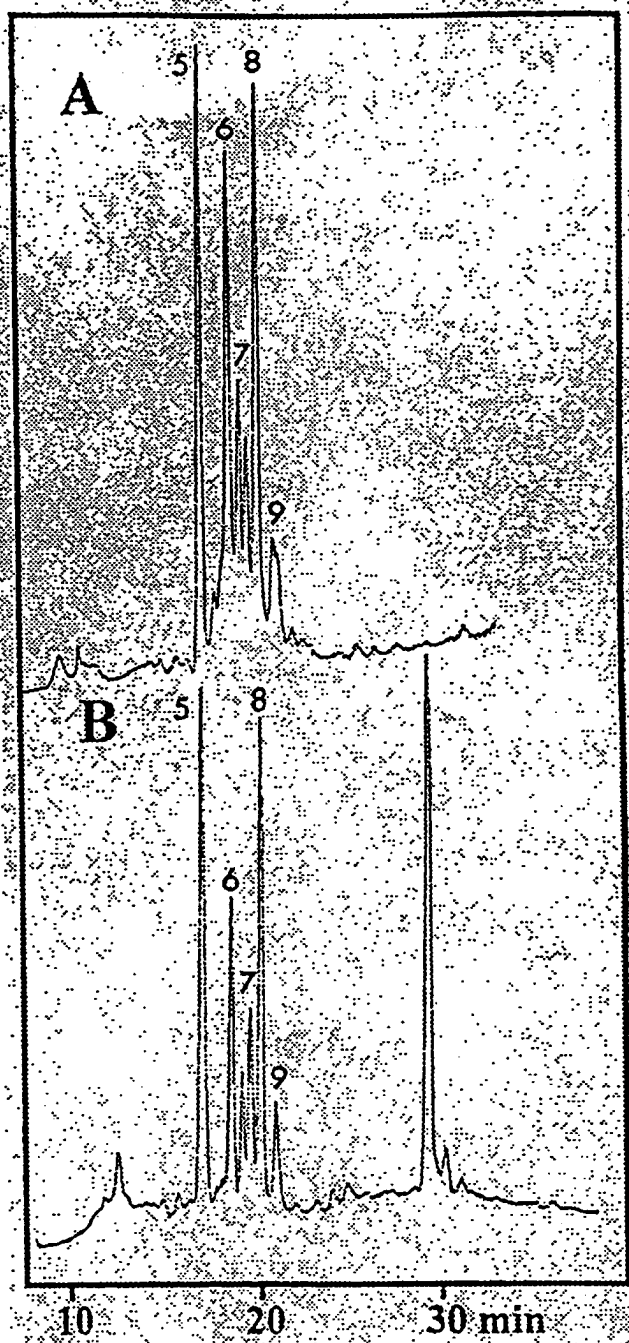


Figure 2

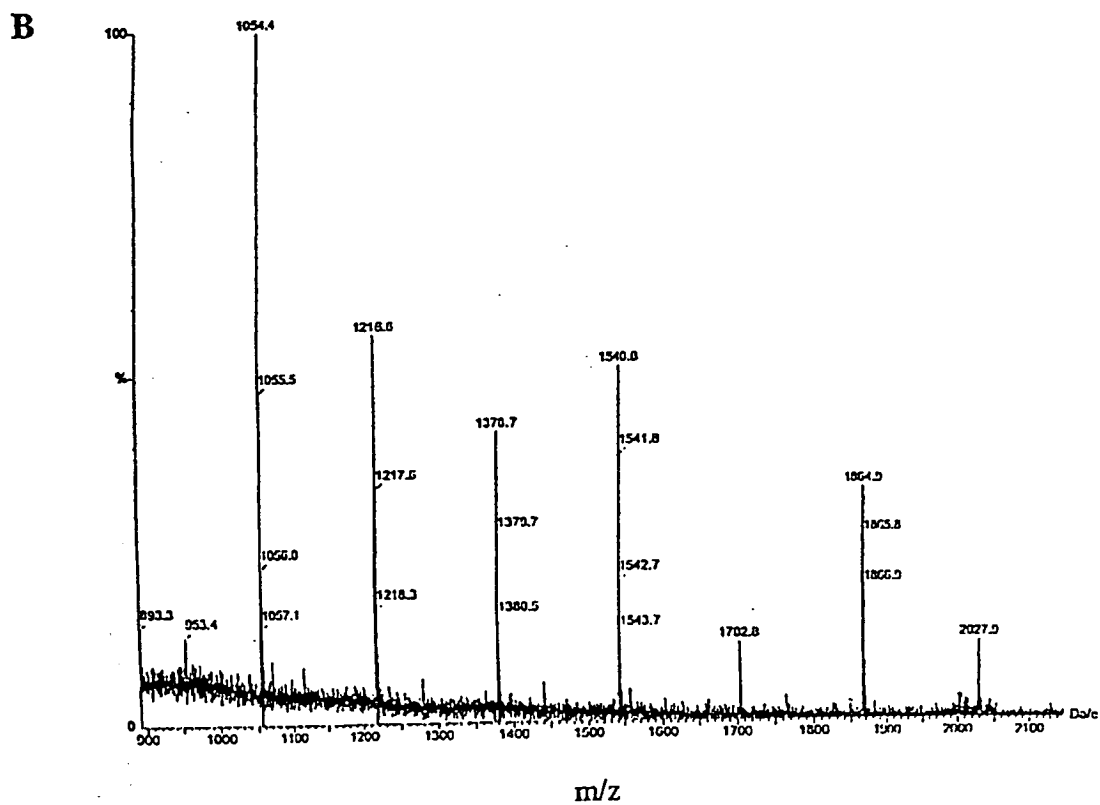
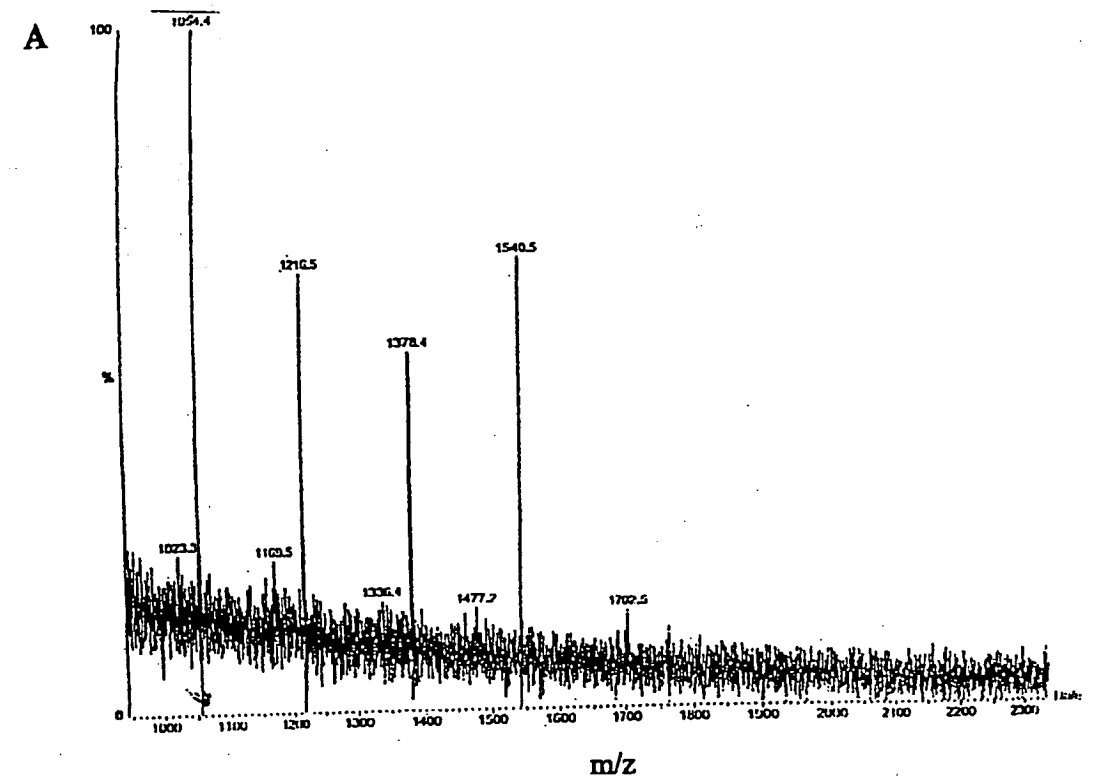


Figure 3



## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; Institut National de la Recherche Agronomique (I.N.R.A.)

&lt;110&gt; Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.)

<120> Nouvelle glucosidase I de plante, son application à la  
production de protéines recombinantes à glycosylation  
modifiée

&lt;130&gt; INRA Glucosidase 1 de A. thaliana

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 15

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 852

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 1

Met Thr Gly Ala Ser Arg Arg Ser Ala Arg Gly Arg Ile Lys Ser Ser  
1 5 10 15Ser Leu Ser Pro Gly Ser Asp Glu Gly Ser Ala Tyr Pro Pro Ser Ile  
20 25 30Arg Arg Gly Lys Gly Lys Glu Leu Val Ser Ile Gly Ala Phe Lys Thr  
35 40 45Asn Leu Lys Ile Leu Val Gly Leu Ile Ile Leu Gly Ile Ile Val Ile  
50 55 60Tyr Phe Val Ile Asn Arg Leu Val Arg His Gly Leu Leu Phe Asp Glu  
65 70 75 80Ser Gln Lys Pro Arg Val Ile Thr Pro Phe Pro Ala Pro Lys Val Met  
85 90 95Asp Leu Ser Met Phe Gln Gly Glu His Lys Glu Ser Leu Tyr Trp Gly  
100 105 110Thr Tyr Arg Pro His Val Tyr Phe Gly Val Arg Ala Arg Thr Pro Leu  
115 120 125Ser Leu Val Ala Gly Leu Met Trp Leu Gly Val Lys Asp Glu Met Tyr  
130 135 140

Val Met Arg His Phe Cys Glu Asn Ser Asp Asp Leu Ser Thr Phe Gly

145	150	155	160
Trp Arg Glu His Asn Gly Arg Asp Tyr Gly Arg Gln Glu Leu Val Glu	165	170	175
Asn Asp Met Val Ile Glu Thr Ser Phe Val Lys Ser Lys Gly Asp Gly	180	185	190
Leu Gly Tyr Gly Gly Asp Trp Ala Val Arg Ile Asp Val Lys Asn Lys	195	200	205
Gly Leu Asn Asp Asp Val Lys Arg Ser Ala His Leu Phe Phe Tyr Leu	210	215	220
Ala Asp Glu Gly Gly Asn Val Leu Asn Leu Gly Gln Asp Gly Leu Asp	225	230	235
Phe Gln Gly Ser Ser Leu Leu Val Ser Gly Ser Arg Glu Asp Val Gly	245	250	255
Asp Trp Gln Ile His Leu Lys Ser Gln Asn Gln Leu Glu Thr His Tyr	260	265	270
Ser Gly Phe Lys Thr Pro His Ile Tyr Asn Leu Ser Asp Leu Val Gln	275	280	285
Gln Asn Leu Ala Leu Gln Ala Arg Lys Phe Gly Arg Leu Gln Leu Ser	290	295	300
Asp Thr Ser Glu Asp Ser Ser Asn Ile Tyr Ile Phe Gln Ile Ser Gly	305	310	315
Arg Leu Pro Phe Thr Ile Asp Ile Pro Phe Ile Ser Gly Ile Lys Gly	325	330	335
Glu Ser Ser Asn Val Glu Lys Arg Leu Thr Ser Leu Thr Gly Leu Pro	340	345	350
Leu Ser Asp Leu Leu Lys Lys Lys His Gln Glu Phe Asp Ala Lys Phe	355	360	365
Asn Glu Cys Phe Asn Leu Ser Glu Lys His Asp Ser Glu Thr Leu Gly	370	375	380
Val Gly Arg Thr Ala Ile Ala Asn Met Leu Gly Gly Ile Gly Tyr Phe	385	390	395
Tyr Gly Gln Ser Lys Ile Tyr Val Pro Lys Ser Thr Gln Pro Gly Ser	405	410	415
Arg Asp Asn Phe Leu Leu Tyr Trp Pro Ala Glu Leu Tyr Thr Ala Val	420	425	430

Pro Ser Arg Pro Phe Phe Pro Arg Gly Phe Leu Trp Asp Glu Gly Phe  
 435 440 445  
 His Gln Leu Leu Ile Trp Arg Trp Asp Ile Arg Ile Thr Leu Asp Ile  
 450 455 460  
 Val Gly His Trp Leu Asp Leu Leu Asn Ile Asp Gly Trp Ile Pro Arg  
 465 470 475 480  
 Glu Gln Ile Leu Gly Ala Glu Ala Leu Ser Lys Val Pro Glu Glu Phe  
 485 490 495  
 Val Val Gln Tyr Pro Ser Asn Gly Asn Pro Pro Thr Leu Phe Leu Val  
 500 505 510  
 Ile Arg Asp Leu Ile Asp Ala Ile Arg Met Glu Lys Phe Val Ala Ser  
 515 520 525  
 Glu Lys Asp Glu Val Leu Ser Phe Leu Glu Arg Ala Ser Val Arg Leu  
 530 535 540  
 Asp Ala Trp Phe Gln Trp Phe Asn Thr Ser Gln Lys Gly Lys Glu Ile  
 545 550 555 560  
 Gly Ser Tyr Phe Trp His Gly Arg Asp Asn Thr Thr Thr Gln Glu Leu  
 565 570 575  
 Asn Pro Lys Thr Leu Ser Ser Gly Leu Asp Asp Tyr Pro Arg Ala Ser  
 580 585 590  
 His Pro Ser Glu Asp Glu Arg His Val Asp Leu Arg Cys Trp Met Tyr  
 595 600 605  
 Arg Ala Ala Asp Cys Met His Ser Ile Thr Glu Leu Leu Gly Lys Glu  
 610 615 620  
 Asp Lys Leu Ser Lys Glu Asn Tyr Asn Ser Thr Ala Lys Leu Leu Ser  
 625 630 635 640  
 Asn Phe Asn Leu Leu Asn Gln Met His Tyr Asp Ser Asp Tyr Gly Ala  
 645 650 655  
 Tyr Phe Asp Phe Gly Asn His Thr Glu Lys Val Lys Leu Ile Trp Lys  
 660 665 670  
 Glu Val Ile Gln Glu Asn Gly Gln Leu Ser Arg Gln Leu Val Arg Lys  
 675 680 685  
 Thr Phe Gly Lys Pro Lys Leu Lys Leu Val Pro His Leu Gly Tyr Val  
 690 695 700

Ser Phe Phe Pro Phe Met Ser Arg Ile Ile Pro Pro Asp Ser Pro Ile  
 705 710 715 720  
 Leu Glu Lys Gln Leu Asn Leu Ile Ser Asn Arg Ser Ile Leu Trp Ser  
 725 730 735  
 Asp Tyr Gly Leu Val Ser Leu Ala Lys Thr Ser Ser Met Tyr Met Lys  
 740 745 750  
 Arg Asn Thr Glu His Asp Ala Pro Tyr Trp Arg Gly Pro Ile Trp Met  
 755 760 765  
 Asn Met Asn Tyr Met Ile Leu Ser Ser Leu Tyr His Tyr Ser Ile Val  
 770 775 780  
 Asp Gly Pro Tyr Arg Glu Lys Ser Lys Ala Ile Tyr Thr Glu Leu Arg  
 785 790 795 800  
 Ser Asn Leu Ile Arg Asn Val Val Arg Asn Tyr Tyr Glu Thr Gly Tyr  
 805 810 815  
 Ile Trp Glu Gln Tyr Asp Gln Val Lys Gly Thr Gly Lys Gly Thr Arg  
 820 825 830  
 Leu Phe Thr Gly Trp Ser Ala Leu Thr Leu Leu Ile Met Ser Glu Asp  
 835 840 845  
 Tyr Pro Ile Phe  
 850

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2559

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 2

atgaccggag ctagccgctg gagcgcgctt ggtcgaaatca aatcatcatc attatctccc 60  
 ggctccgatg aaggaagcgc ttatcctccg agtatccgcc gcggcaaagg caaggaactt 120  
 gtatcgatcg gtgctttcaa gacgaatctc aagatattgg ttgggttaat catattaggg 180  
 attatagtaa tctacttcgt aatcaatcgg ctagttcgtc acgggttggt gtttgatgag 240  
 tcccagaagc ctagggttat cactcctttt cctgctccga aagtcattga tttgtcaatg 300  
 tttcagggcg agcacaaga gagcttatac tggggaactt atcgtcctca tgtttatttt 360  
 ggagttcgag ctagaactcc attgtccttg gtagctggct tgatgtggct tgggtgtcaa 420  
 gatgagatgt atgttatgcy gcatttctgt gaaaactctg atgatttaag tacatttggc 480  
 tggagagaac ataattggagc ggattatggt cggcaagagc tgggttgaaa cgatatggta 540  
 atagagacga gttttgtgaa gtccaaggga gacggccttg gttatggtgg ggattgggca 600  
 gttcggattg atgtaaaaaa taaagggttg aatgatgatg tgaagagaag tgcacatctc 660  
 ttcttttatt tagctgatga aggtggcaat gttttaaatt taggccaaga tgggttagat 720  
 ttccaaggga gctctctcct ggtttcgggg tcacgtgaag atgtaggaga ctggcagata 780  
 cacttaaaat cacagaatca gctcgagaca cattattccg gtttcaagac gcctcacata 840

```

tataatattgt ctgatctagt tcagcaaaat cttgctctgc aggcaaggaa gtttggacga 900
cttcagctct ctgacacatc agaggattct tctaacattt acatctttca gatttctggg 960
aggctaccat ttacgattga tattcccttc atctccggga tcaaaggaga aagttcaaat 1020
gtggaaaagc gtttaacaag tctcacaggt ttgccactct ctgatctact taaaaagaaa 1080
catcaagaat ttgatgcaaa gtttaaatgaa tgcttcaacc tttctgaaaa gcatgattca 1140
gaaacattgg gggttggaag gactgcaatt gcaaacatgc ttggggggcat tggttacttc 1200
tatggccaat caaaaattta tggtcctaaa agcactcagc ctggaagtcg ggataatttc 1260
ttgctgtatt ggccagccga gctgtacaca gctgttccaa gccgacctt ttttctagg 1320
gggtttttgt gggacgaagg tttccatcaa ttgttgatct ggcggtggga tattcgtata 1380
accttggata tcgttggaca ctggttagac ctattgaaca tagatggatg gattccacgt 1440
gagcaaatat tgggtgctga agctttgagt aaggttccag aggaattcgt agttcaatac 1500
ccgagtaatg gcaatccacc aactctgttt ttggtgatac gtgatctgat tgacgctata 1560
aggatggaaa agtttgcgc atcagaaaag gatgaagtat tgtcattcct tgagcgagct 1620
tctgtacgct tagatgcttg gtttcagtggt ttaataactt cccagaaagg caaggagatc 1680
ggaagctact tttggcatgg cagagacaac acaacaactc aagaacttaa ccctaagacg 1740
ctttcgtcgg ggctggatga ttatccccgg gcttcgcacc ctagtgaaga tgagcgacat 1800
gttgatctta gatgctggat gtaccgtgct gcagattgca tgcattccat cacagagctt 1860
ttaggaaaag aagacaaact ttcaaaggag aattacaatt caactgccaa gctgctttca 1920
aatttcaatc ttctgaatca gatgcactat gatagtgaat atggggctta ctttgacttt 1980
ggcaatcata cagaaaaagt taagttgata tggaaagagg taattcaaga aaatggtcaa 2040
ttatctcgac aacttgtaag gaagactttt ggggaagccaa agctaaaatt ggttctctac 2100
ttgggttacg tcagcttctt tcccttcag tctagaatca tcccacctga ttctccaatt 2160
ctcgagaaac agctcaatct catttcaaat aggagcatct tatggagtga ctatggacta 2220
gtttcgtctg ccaaaaccag ttctatgtat atgaaacgta acactgagca tgatgcacca 2280
tactggagag gtcctatatg gatgaacatg aactacatga ttctttcttc tctttaccat 2340
tactctatag tgatgggacc gtatagagaa aagtcgaaag caatttacac ggaactaagg 2400
agcaatttga taaggaaagt ggttagaaac tattacgaga cggggtacat ctgggaacaa 2460
tatgatcaag ttaagggaac aggcaaaggc acgctctctt tcaccggctg gtctgcgctt 2520
accttggtta ttatgtcaga agattatcct attttttag 2559

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 3

atgaccggag ctagccgtcg

20

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 4

aagtttcgtt cccgaagagg

20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 43

&lt;212&gt; ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 5

ctaatacgac tcaactatagg gctcgagcgg ccgccccggg agt

43

<210> 6

<211> 8

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)

<223> Groupe phosphorique (PO4) lié en position 5' du  
sucre

<220>

<221> misc\_feature

<222> (8)

<223> Groupe amino en position 3' du sucre

<400> 6

acctcccc

8

<210> 7

<211> 27

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 7

ggatcctaatac gactcact atagggc

27

<210> 8

<211> 18

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

ctatagggct cgagcggc

18

<210> 9

<211> 16

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 9

ggcgcggcgg ggaggt

16

<210> 10  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10  
tcgttaaaac tgccctggcac agc

23

<210> 11  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 11  
ccagactgaa tgcccacagc ccgtc

25

<210> 12  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 12  
tcacggggttg gggttctaca ggac

24

<210> 13  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 13  
cggctatttg taataggaca ctgg

24

<210> 14  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 14  
caaccctcaa ctggaaacgg gccgga

26

<210> 15  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 15

cgtgtgccag gtgcccacgg aatagt



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01266

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/56 C12N15/82 C12Q1/68 C12N9/24 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A01H C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, WPI Data, EPO-Internal, EMBL, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 23079 A (CLONTECH LAB INC) 1 August 1996 (1996-08-01) SEQ ID NO:15 ---	1,2,4-8
X	WO 00 00643 A (BHATTACHARJEE JNANENDRA K ;UNIV MIAMI (US); BHATTACHERJEE VASKER ()) 6 January 2000 (2000-01-06) page 29, line 5 - line 6 ---	1,2,4-8
P,X	WO 01 11061 A (UNIV BRITISH COLUMBIA ;CLEMENS SABINE (CA); KUNST LJERKA (CA)) 15 February 2001 (2001-02-15) page 15, line 4 page 15, line 7 --- -/--	1,2,4-8



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 September 2001

Date of mailing of the international search report

24. 09. 2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01266

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 00 78975 A (DONALDSON IAIN ALASDAIR ;DANISCO (DK); RASMUSSEN THOMAS BRUUN (DK)) 28 December 2000 (2000-12-28) page 67 AP1 primer ---	1,2,4-8
P,X	EP 1 033 405 A (CERES INC) 6 September 2000 (2000-09-06)  voir SEQ ID No. 36365,36366,36367,36364. Reference table 2 page 8446-8447 page 42896 -page 42902 ---	1-10,13, 14,35, 36,38,39
P,X	BOISSON MURIELLE ET AL: "Arabidopsis glucosidase I mutants reveal a critical role of N-glycan trimming in seed development." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 20, no. 5, 1 March 2001 (2001-03-01), pages 1010-1019, XP002177530 ISSN: 0261-4189 the whole document -& DATABASE EMBL [Online] ACCESSION NO: AJ278990, 19 March 2001 (2001-03-19) LEPINIEC L.: " Arabidopsis thaliana gcs1 gene for alpha-glucosidase 1, exons 1-22" XP002177531 abstract ---	1-22, 25-29, 31-39
P,X	DATABASE EMBL [Online] ACCESSION NO: AV549758, 16 June 2000 (2000-06-16) NAKAMURA, Y., ET AL.: "Arabidopsis thaliana cDNA clone:RZ102d07R, 5' end." XP002177532 the whole document ---	1-10
X	DATABASE EMBL [Online] ACCESSION NO: AC011020, 6 October 1999 (1999-10-06) LIN, X., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC F12B7 genomic sequence, complete sequence." XP002157288 voir complément inverse nts 13083-109031 gene="F12B7.4",product="putative glucosidase I" & DATABASE TREMBL [Online] ACCESSION NO: Q9SR56, 1 May 2000 (2000-05-01) LIN X.: "PUTATIVE GLUCOSIDASE I." the whole document --- -/--	1-10,13, 14,35, 36,38,39

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01266

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL [Online]  ACCESSION NO: AC004393,  16 March 1998 (1998-03-16)  THEOLOGIS A.: "Arabidopsis thaliana  chromosome 1 BAC T1F15 sequence, complete  sequence."  XP002157289  voir nts 20807-26755,  gene="T1F15.4"/,note="Similar to  mannosyl-oligosaccharide glucosidase gb  X87237 from Homo sapiens."  -&amp; DATABASE TREMBL [Online]  ACCESSION NO: 064796,  1 August 1998 (1998-08-01)  VYSOTSKAIA V.S.: "T1F15.4 PROTEIN."  XP002157290  the whole document</p>	<p>1-10,13,  14,35,  36,38,39</p>
X	<p>---  DATABAS EMBL [Online]  ACCESSION NO: AI999291,  9 September 1999 (1999-09-09)  CHEN, J., ET AL.: "701555287 A. thaliana,  Columbia Col-0, rosette-3 Arabidopsis  thaliana cDNA clone 701555287, mRNA  sequence."  XP002157291  the whole document</p>	<p>1-10</p>
X	<p>---  DATABAS EMBL [Online]  ACCESSION NO: AC002396,  7 August 1997 (1997-08-07)  FEDERSPIEL, N.A., ET AL.: "Arabidopsis  thaliana chromosome I BAC F316 genomic  sequence, complete sequence."  XP002157292  voir complément invers nts  105749-110247./note="Hypothetical protein;  similar to a-glucosidase I, gp X87237  2344810". /gene="F316.26"  -&amp; DATABASE TREMBL [Online]  ACCESSION NO: 048699,  1 June 1998 (1998-06-01)  FEDERSPIEL, N.A., ET AL.: "F316.26  PROTEIN."  XP002157293  the whole document</p>	<p>38,39</p>
X	<p>---  CHRISPEELS, M.J., ET AL.: "Rien ne sert  de produire, il faut glycosyler"  BIOFUTUR,  vol. 184, December 1998 (1998-12), pages  53-57, XP002157284  cited in the application  the whole document</p> <p>---</p>	<p>44-47</p>

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01266

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 29879 A (VON SCHAEWEN ANTJE) 17 June 1999 (1999-06-17) the whole document	44-47
X	--- PALACPAC NQ ET AL: "Stable expression of human betal,4-galactosyltransferase in plant cells difies N-linked glycosylation patterns" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA,NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON,US, vol. 96, no. 8, 13 April 1999 (1999-04-13), pages 4692-4697, XP002133652 ISSN: 0027-8424 the whole document	44-47
X	--- LEROUGE PATRICE ET AL: "N-linked oligosaccharide processing is not necessary for glycoprotein secretion in plants." PLANT JOURNAL, vol. 10, no. 4, 1996, pages 713-719, XP002157285 ISSN: 0960-7412 the whole document	44-47
P,X	--- WO 00 34490 A (FUJIYAMA KAZUHITO ;SEKI TATSUJI (JP); YOSHIDA TOSHIOMI (JP)) 15 June 2000 (2000-06-15) the whole document	44-47
A	--- ZENG Y -C ET AL: "Purification to homogeneity and properties of plant glucosidase I." ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 355, no. 1, 1 July 1998 (1998-07-01), pages 26-34, XP002157286 ISSN: 0003-9861 the whole document	1-47
A	--- DATABASE EMBL [Online] ACCESSION NO: AW102351, 20 October 1999 (1999-10-20) SHOEMAKER, R., ET AL.: "sd86e12.y1 Gm-c1009 Glycine max cDNA clone GENOME SYSTEMS CLONE ID:Gm-c1009-1319 5' similar to TR:064796 064796 T1F15.4 PROTEIN. ;, mRNA sequence." XP002157294 the whole document	1-10
	--- -/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/01266

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LEROUGE PATRICE ET AL: "N-glycoprotein biosynthesis in plants: Recent developments and future trends."            PLANT MOLECULAR BIOLOGY,            vol. 38, no. 1-2, 1998, pages 31-48,            XP002157287            ISSN: 0167-4412            the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-47
A	<p>GOMEZ L AND CHRISPEELS M J:            "Complementation of an Arabidopsis thaliana mutant that lacks complex asparagine-linked glycans with the human cDNA encoding            N-acetylglucosaminyltransferase I"            PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US,            vol. 91, March 1994 (1994-03), pages 1829-1833, XP002100921            ISSN: 0027-8424            the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-47

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/01266

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9623079	A	01-08-1996	US 5565340 A AU 4774196 A EP 0753075 A1 JP 9511149 T WO 9623079 A2 US 5759822 A	15-10-1996 14-08-1996 15-01-1997 11-11-1997 01-08-1996 02-06-1998
WO 0000643	A	06-01-2000	AU 4838599 A WO 0000643 A2	17-01-2000 06-01-2000
WO 0111061	A	15-02-2001	AU 6551300 A WO 0111061 A2	05-03-2001 15-02-2001
WO 0078975	A	28-12-2000	AU 6166300 A WO 0078975 A2	09-01-2001 28-12-2000
EP 1033405	A	06-09-2000	EP 1033405 A2	06-09-2000
WO 9929879	A	17-06-1999	DE 19754622 A1 AU 2268899 A WO 9929879 A1 EP 1038014 A1	10-06-1999 28-06-1999 17-06-1999 27-09-2000
WO 0034490	A	15-06-2000	AU 1681300 A WO 0034490 A1	26-06-2000 15-06-2000

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 01/01266

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 7    C12N15/56    C12N15/82    C12Q1/68    C12N9/24    A01H5/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7    C12N    A01H    C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) BIOSIS, WPI Data, EPO-Internal, EMBL, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 23079 A (CLONTECH LAB INC) 1 août 1996 (1996-08-01) SEQ ID NO:15 ---	1,2,4-8
X	WO 00 00643 A (BHATTACHARJEE JNANENDRA K ;UNIV MIAMI (US); BHATTACHERJEE VASKER ( ) 6 janvier 2000 (2000-01-06) page 29, ligne 5 - ligne 6 ---	1,2,4-8
P,X	WO 01 11061 A (UNIV BRITISH COLUMBIA ;CLEMENS SABINE (CA); KUNST LJERKA (CA)) 15 février 2001 (2001-02-15) page 15, ligne 4 page 15, ligne 7 --- <div style="text-align: center;">-/-</div>	1,2,4-8
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">14 septembre 2001</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">24.09.2001</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentilaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Maddox, A</div>

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	WO 00 78975 A (DONALDSON IAIN ALASDAIR ;DANISCO (DK); RASMUSSEN THOMAS BRUUN (DK)) 28 décembre 2000 (2000-12-28) page 67 AP1 primer ---	1,2,4-8
P,X	EP 1 033 405 A (CERES INC) 6 septembre 2000 (2000-09-06)  voir SEQ ID No. 36365,36366,36367,36364. Reference table 2 page 8446-8447 page 42896 -page 42902 ---	1-10,13, 14,35, 36,38,39
P,X	BOISSON MURIELLE ET AL: "Arabidopsis glucosidase I mutants reveal a critical role of N-glycan trimming in seed development." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 20, no. 5, 1 mars 2001 (2001-03-01), pages 1010-1019, XP002177530 ISSN: 0261-4189 le document en entier -& DATABASE EMBL [en ligne] ACCESSION NO: AJ278990, 19 mars 2001 (2001-03-19) LEPINIEC L.: " Arabidopsis thaliana gcs1 gene for alpha-glucosidase 1, exons 1-22" XP002177531 abrégé ---	1-22, 25-29, 31-39
P,X	DATABASE EMBL [en ligne] ACCESSION NO: AV549758, 16 juin 2000 (2000-06-16) NAKAMURA, Y., ET AL.: "Arabidopsis thaliana cDNA clone:RZ102d07R, 5' end." XP002177532 le document en entier ---	1-10
X	DATABASE EMBL [en ligne] ACCESSION NO: AC011020, 6 octobre 1999 (1999-10-06) LIN, X., ET AL.: "Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC F12B7 genomic sequence, complete sequence." XP002157288 voir complément inverse nts 13083-109031 gene="F12B7.4",product="putative glucosidase I" & DATABASE TREMBL [en ligne] ACCESSION NO: Q9SR56, 1 mai 2000 (2000-05-01) LIN X.: "PUTATIVE GLUCOSIDASE I." le document en entier --- -/--	1-10,13, 14,35, 36,38,39



## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. e Internationale No

PCT/FR 01/01266

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE EMBL [en ligne]  ACCESSION NO: AC004393,  16 mars 1998 (1998-03-16)  THEOLOGIS A.: "Arabidopsis thaliana  chromosome 1 BAC T1F15 sequence, complete  sequence."  XP002157289  voir nts 20807-26755,  gene="T1F15.4"/,note="Similar to  mannosyl-oligosaccharide glucosidase gb  X87237 from Homo sapiens."  -&amp; DATABASE TREMBL [en ligne]  ACCESSION NO: 064796,  1 août 1998 (1998-08-01)  VYSOTSKAIA V.S.: "T1F15.4 PROTEIN."  XP002157290  le document en entier</p> <p>---</p>	1-10,13, 14,35, 36,38,39
X	<p>DATABASE EMBL [en ligne]  ACCESSION NO: AI999291,  9 septembre 1999 (1999-09-09)  CHEN, J., ET AL.: "701555287 A. thaliana,  Columbia Col-0, rosette-3 Arabidopsis  thaliana cDNA clone 701555287, mRNA  sequence."  XP002157291  le document en entier</p> <p>---</p>	1-10
X	<p>DATABASE EMBL [en ligne]  ACCESSION NO: AC002396,  7 août 1997 (1997-08-07)  FEDERSPIEL, N.A., ET AL.: "Arabidopsis  thaliana chromosome I BAC F3I6 genomic  sequence, complete sequence."  XP002157292  voir complément invers nts  105749-110247./note="Hypothetical protein;  similar to a-glucosidase I, gp X87237  2344810". /gene="F3I6.26"  -&amp; DATABASE TREMBL [en ligne]  ACCESSION NO: 048699,  1 juin 1998 (1998-06-01)  FEDERSPIEL, N.A., ET AL.: "F3I6.26  PROTEIN."  XP002157293  le document en entier</p> <p>---</p>	38,39
X	<p>CHRISPEELS, M.J., ET AL.: "Rien ne sert  de produire, il faut glycosyler"  BIOFUTUR,  vol. 184, décembre 1998 (1998-12), pages  53-57, XP002157284  cité dans la demande  le document en entier</p> <p>---</p>	44-47

-/--

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 01/01266

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99 29879 A (VON SCHAEWEN ANTJE) 17 juin 1999 (1999-06-17) le document en entier ---	44-47
X	PALACPAC NQ ET AL: "Stable expression of human betal,4-galactosyltransferase in plant cells defines N-linked glycosylation patterns" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 96, no. 8, 13 avril 1999 (1999-04-13), pages 4692-4697, XP002133652 ISSN: 0027-8424 le document en entier ---	44-47
X	LEROUGE PATRICE ET AL: "N-linked oligosaccharide processing is not necessary for glycoprotein secretion in plants." PLANT JOURNAL, vol. 10, no. 4, 1996, pages 713-719, XP002157285 ISSN: 0960-7412 le document en entier ---	44-47
P,X	WO 00 34490 A (FUJIYAMA KAZUHIITO ;SEKI TATSUJI (JP); YOSHIDA TOSHIOMI (JP)) 15 juin 2000 (2000-06-15) le document en entier ---	44-47
A	ZENG Y -C ET AL: "Purification to homogeneity and properties of plant glucosidase I." ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 355, no. 1, 1 juillet 1998 (1998-07-01), pages 26-34, XP002157286 ISSN: 0003-9861 le document en entier ---	1-47
A	DATABASE EMBL [en ligne] ACCESSION NO: AW102351, 20 octobre 1999 (1999-10-20) SHOEMAKER, R., ET AL.: "sd86e12.y1 Gm-cl009 Glycine max cDNA clone GENOME SYSTEMS CLONE ID:Gm-cl009-1319 5' similar to TR:064796 064796 T1F15.4 PROTEIN. ;, mRNA sequence." XP002157294 le document en entier ---	1-10
	---	

-/--

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>LEROUGE PATRICE ET AL: "N-glycoprotein biosynthesis in plants: Recent developments and future trends."  PLANT MOLECULAR BIOLOGY,  vol. 38, no. 1-2, 1998, pages 31-48,  XP002157287  ISSN: 0167-4412  le document en entier  ---</p>	1-47
A	<p>GOMEZ L AND CHRISPEELS M J:  "Complementation of an Arabidopsis thaliana mutant that lacks complex asparagine-linked glycans with the human cDNA encoding  N-acetylglucosaminyltransferase I"  PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US,  vol. 91, mars 1994 (1994-03), pages 1829-1833, XP002100921  ISSN: 0027-8424  le document en entier  -----</p>	1-47

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 01/01266

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9623079	A	01-08-1996	US 5565340 A AU 4774196 A EP 0753075 A1 JP 9511149 T WO 9623079 A2 US 5759822 A	15-10-1996 14-08-1996 15-01-1997 11-11-1997 01-08-1996 02-06-1998
WO 0000643	A	06-01-2000	AU 4838599 A WO 0000643 A2	17-01-2000 06-01-2000
WO 0111061	A	15-02-2001	AU 6551300 A WO 0111061 A2	05-03-2001 15-02-2001
WO 0078975	A	28-12-2000	AU 6166300 A WO 0078975 A2	09-01-2001 28-12-2000
EP 1033405	A	06-09-2000	EP 1033405 A2	06-09-2000
WO 9929879	A	17-06-1999	DE 19754622 A1 AU 2268899 A WO 9929879 A1 EP 1038014 A1	10-06-1999 28-06-1999 17-06-1999 27-09-2000
WO 0034490	A	15-06-2000	AU 1681300 A WO 0034490 A1	26-06-2000 15-06-2000